# Zur Analytik und Toxikologie einiger N-haltiger Herbicide und Fungicide

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Bothe

aus Godendorf

Berlin 1974

# Zur Analytik und Toxikologie einiger N-haltiger Herbicide und Fungicide

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Bothe

aus Godendorf

Berlin 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. K.H. Beyer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Kreutzberger

Letzter Tag der mündlichen Prüfung: 20. September 1974

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und in der Abteilung Klinische Pharmakologie des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Priv.Doz. Dr. K.H. Beyer danke ich für die Oberlassung des Themas, seine großzügige Hilfe und die Freizügigkeit, welche er mir bei der Gestaltung der Dissertation ließ. Herrn Priv.Doz. Dr. A. Hildebrandt danke ich sehr herzlich für die Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der toxikologischen Untersuchungen.

Für die Beschaffung der Arbeitsmöglichkeiten bin ich Herrn Prof. Dr. G. Schenck und Herrn Prof. Dr. H. Kewitz zu besonderem Dank verpflichtet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0004

Inhaltsverzeichnis


I. Einleitung und Problemstellung 1

II. Allgemeiner Teil 12

1. Quantitative Diquatbestimmung aus biologischem Material 12

2. Quantitative Morfamquatbestimmung aus biologischem Material 34

3. Quantitative Dodemorphbestimmung aus biologischem Material 52

4. Quantitative Tridemorphbestimmung aus biologischem Material 58

5. Toxikologische Untersuchungen an Bispyridiniumverbindungen 60

5.1 Untersuchungen zum Resorptionsverhalten von Bispyridiniumherbiciden 60

5.2 In vitro Einflüsse von Bispyridiniumherbiciden auf Mitochondrien 65

5.3 In vivo Einflüsse von Bispyridiniumherbiciden auf Mitochondrien 76

5.4 Einflüsse der Bispyridiniumherbicide auf die mikrosomale Fraktion 79

III. Zusammenfassung 82

IV. Experimenteller Teil 84

1. Allgemeine Angaben 84

2. Paraquat, Diquat, Morfamquat 85

3. Dodemorph, Tridemorph 86

4. Dodemorphmethojodid 86

5. Dodemorphpikrat 86

6. Paraquatbestimmung 86

7. Diquatbestimmung 87

8. Morfamquatbestimmung 89

9. Mitochondrienpräparation 90

10. Mikrosomenpräparation 92

11. Proteinbestimmung 92

12. Atmungsmessungen 92

13. Isolierung der basischen Zersetzungsprodukte des Morfamquats 94

14. Messungen der Stabilität der Diquat- und Morfamquatradikale 95

15. Vorbereitung der Versuchstiere 95

15.1 Resorptionsuntersuchungen 95

15.2 Sterblichkeit von Ratten nach Gabe von Reinsubstanz und Handelspräparat 96

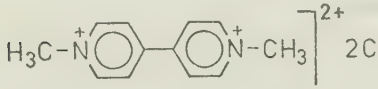
15.3 Mitochondrienschädigung 96

15.4 Einfluß von Enzyminduktion und Ascorbinsäuregabe auf die Sterblichkeit von Versuchstieren 96

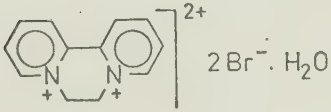
V. Literaturverzeichnis 97

## I. Einleitung und Problemstellung

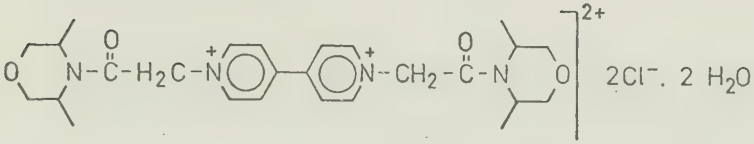
Als erste der als Herbicide im Handel befindlichen Bispyridiniumverbindungen Paraquat (I), Diquat (II) und Morfamquat (III)




I




II




III

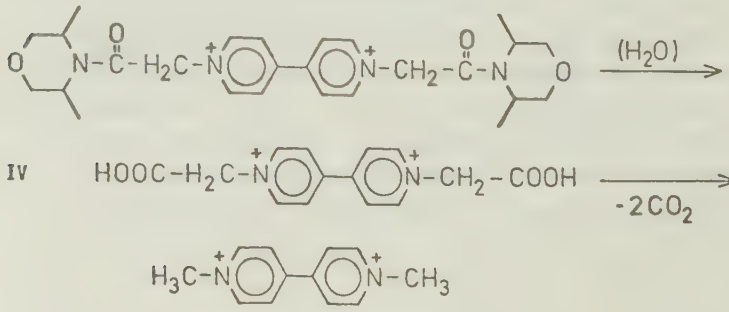
wurde 1882 von H. Weidel und M. Russo (1) die 1,1´-Dimethyl- - 4,4´dipyridilium Verbindung als Dibromid beschrieben. Diese quartäre Ammoniumbase, später auch als Dichlorid und Di-methylsulfat dargestellt, fand in den folgenden Jahrzehnten unter dem Namen Methylviologen als Redoxindikator weite Verbreitung.

Die herbicide Wirksamkeit dieser Verbindungsklasse wurde zuerst beim Diquat im Jahre 1958 entdeckt (2). 1963 wurde von R.S.L. Jeater (3) diese Einsatzmöglichkeit auch für Paraquat beschrieben. Während diese beiden Verbindungen ohne Selektivität auf alle chlorophyllhaltigen Gewebe einwirken, wurde bei Morfamquat vor allem eine spezielle Abtötung von Dikotyledonen beobachtet. Auf diesen Unterschieden beruhen die Einsatzmöglichkeiten der drei Herbicide. Paraquat und Diquat werden zur Totalbekämpfung von

Unkräutern vor der Aussaat der Kulturpflanzen verwendet. Die Herbicidwirkung muß abgeschlossen sein, bevor letztere keimen, da bei diesen beiden Verbindungen alle grünen Pflanzen gleich geschädigt werden. Dies bedingt auch den Einsatz von Paraquat und Diquat als Desiccantien. Bei Kulturpflanzen, deren unterirdische Teile als Nahrungsmittel Verwendung finden, werden beide Substanzen kurz vor der Ernte zur Abtötung der oberirdischen Sproßteile benutzt, um eine leichte Einbringung zu ermöglichen. Neben dem großflächigen Einsatz finden Paraquat und Diquat im Zierpflanzenanbau mit gleicher Zielsetzung Verwendung.

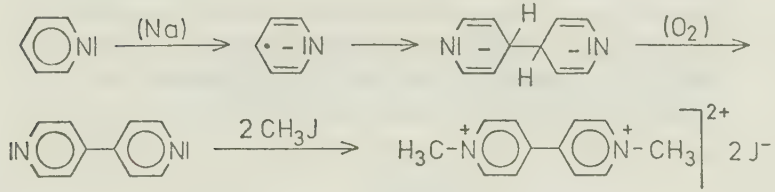
1,1'-Bis-(3,5-dimethylmorpholinocarbamoylmethyl)-4,4'-bispyridinium-dichlorid (III), Morfamquat, dagegen wirkt auf Monokotyledonen bei Konzentrationen, die bei den beiden vorhergenannten Verbindungen zur Anwendung kommen, nicht. Es eignet sich daher im Getreideanbau als Herbicid während der Vegetationsperiode ebenso wie zur Unkrautvernichtung auf Rasenflächen.

Zur Erklärung dieser selektiven Wirksamkeit bestehen zwei Theorien (4). Nach der einen soll das Morpholid Morfamquat in der Pflanze zur herbicidwirksamen freien Säure (IV) oder weiter zu Paraquat metabolisiert werden. Dieser Abbau sei aber nur bei Dikotyledonen möglich. Nach der anderen soll Morfamquat durch verändertes Resorptions- und Penetrationsverhalten den nachfolgend beschriebenen Eingriff der Bispyridiniumverbindungen in die Photosynthese nicht bewirken können.



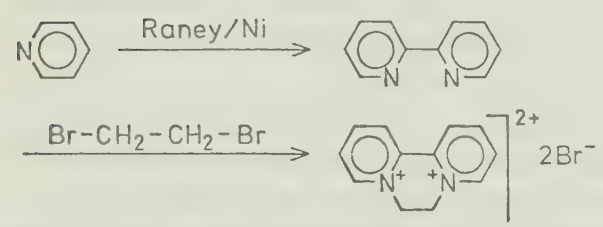
Die Synthese des 4,4'-Bispyridins wird nach Hofmann folgendermaßen durchgeführt (5): Pyridin wird durch Natrium zum Radikal (V) reduziert. Dieses dimerisiert leicht (VI). Mit Sauerstoff erfolgt die Oxidation zum 4,4'-Bispyridin. Eine Methylierung mit gebräuchlichen Methylierungsmitteln führt dann zum Paraquat.

V VI




2,2'-Bispyridin (VII) erhält man durch Umsetzung von Pyridin mit Raney/Nickel. Die Dimerisierung in o-Stellung wird vermutlich durch eine Oberflächenreaktion am Katalysator erreicht (6). Durch Einsatz entsprechender Dihalogenalkane erfolgt die Brückenbildung zwischen den N-Atomen, 1,2 Dibromäthan z.B. führt zum Äthylen-bispyridinium-dibromid, dem Diquat (II).

VII

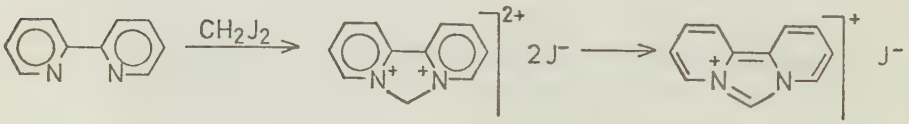



Nachdem die Herbicidwirksamkeit von Diquat und Paraquat bekannt geworden war, wurden die quartären Salze der Bispyridine systematisch auf diese Eigenschaft untersucht. Dabei erwiesen sich

2,3´ und 3,3´Bispyridiniumverbindungen als unwirksam, 2,4´Verbindungen als wenig wirksam (7). Ferner zeigte sich bei allen untersuchten Substanzen, daß eine Substitution am Pyridinring eine mehr oder weniger starke Verminderung der herbiciden Aktivität, in einigen Fällen aber eine Erhöhung der Selektivität mit sich brachte (8, 9).

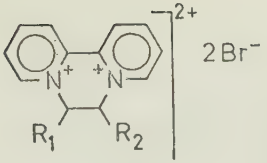
In der Reihe der 2,2´Bispyridiniumverbindungen zeigte Diquat die größte Wirksamkeit. Setzt man zur Quaternisierung des 2,2´Bispyridins statt 1,2-Dibromäthan Methylenbromid ein, so erhält man nicht nur die entsprechende Methylenverbindung, sondern ein Gemisch aus dieser (VIII) und (IX). Letztere entsteht durch Dehydrierung der primär gebildeten Methylenverbindung (10, 11).

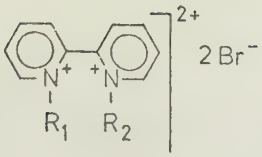
VII VIII IX

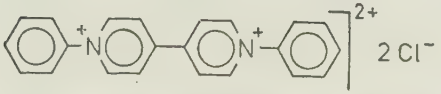



Beide Substanzen besitzen, wenn auch schwächer als Diquat, ebenfalls herbicide Eigenschaften. Auch Brückenverlängerung durch Verwendung von 1,3-Dibrompropan ergibt ein Molekül mit abgeschwächter Herbicidwirksamkeit. Quaternierung mit 1,4-Dibrombutan führt zu einer wirkungslosen Verbindung. Substituenten an der Äthylenbrücke (X) verringern ebenfalls die herbicide Potenz. Offenkettige Quaternierung (XI) führt zu wirkungslosen Präparaten.

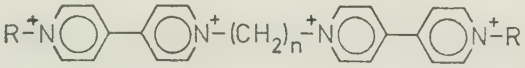
Auch zur Quaternierung des 4,4´Bispyridins wurden verschiedene Alkylgruppen eingesetzt. Sie zeigten gegenüber dem Methylviologen jedoch lediglich eine abgeschwächte Wirksamkeit. Das Benzylviologen (XII), das ebenso wie das Methylviologen als Redoxindikator eingesetzt wird, war als Herbicid gänzlich unwirksam.

X 

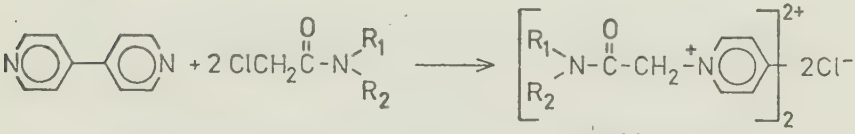

XI

XII 

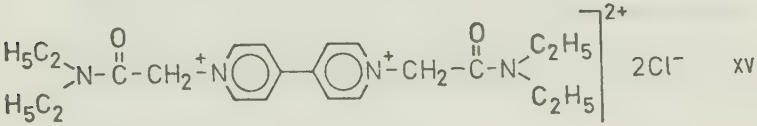
Ebenso brachten Verbindungen höhermolekularer Art (XIII) keine Wirkungsverbesserung.

XIII 

Auf Grund ihrer selektiven Herbicidwirksamkeit erlangte jedoch die Quaternierung des 4,4´Bispyridins mit Essigsäureamidderivaten Bedeutung (XIV).

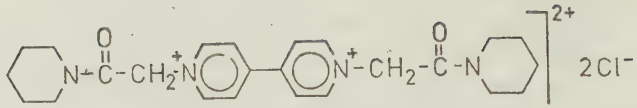

XIV

Im Handel befindet sich unter dem Namen Rasen Primus[+)] das Morfamquat (III).

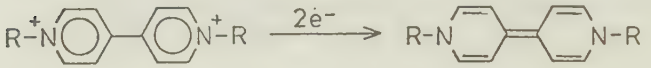

XV

Daneben wurden 15 weitere Verbindungen patentiert (12). Als wichtigste Vertreter dieser Reihe befinden sich das 1,1´-Bis-(diäthylcarbamoylmethyl)-4,4´-bispyridiniumdichlorid (XV) und das 1,1´-Bis-(pentamethylencarbamoylmethyl)-4,4´-bispyridiniumdichlorid (XVI) in Erprobung.

[+)] Celamerck GmbH/Ingelheim

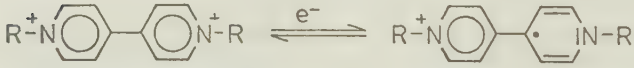
XVI 

2,2' und 4,4'Bispyridiniumsalze lassen sich unter Aufnahme von zwei Elektronen zum Dihydrobispyridyl (XVII) reduzieren (13).



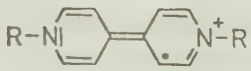
XVII

Dabei ist der Zwischenschritt, die Aufnahme eines Elektrons für die herbicide Wirkung, von entscheidender Bedeutung (XVIII).

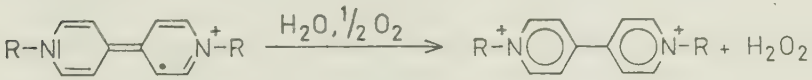


XVIII

Im Gegensatz zum 2-Elektronen-Obergang ist sie leicht reversibel. Das gebildete, wasserlösliche Radikal ist durch Mesomeriestabilisierung ungewöhnlich beständig. Die coplanare Struktur der wirksamen Bispyridiniumverbindungen ermöglicht eine Delokalisierung des Elektrons über die Pyridinringe, so daß 18 mesomere Schreibweisen möglich sind (14). Bei sechs Formulierungen befindet sich die Doppelbindung zwischen den Pyridinringen (XIX).

XIX 

Durch die starke Delokalisierung ist auch die intensive Färbung dieser Radikale zu erklären. Man nutzt sie zur photometrischen Gehaltsbestimmung dieser Verbindungen. In wässriger Lösung wird das Radikal durch Sauerstoff zur Ausgangsverbindung oxidiert (XX).

XX 

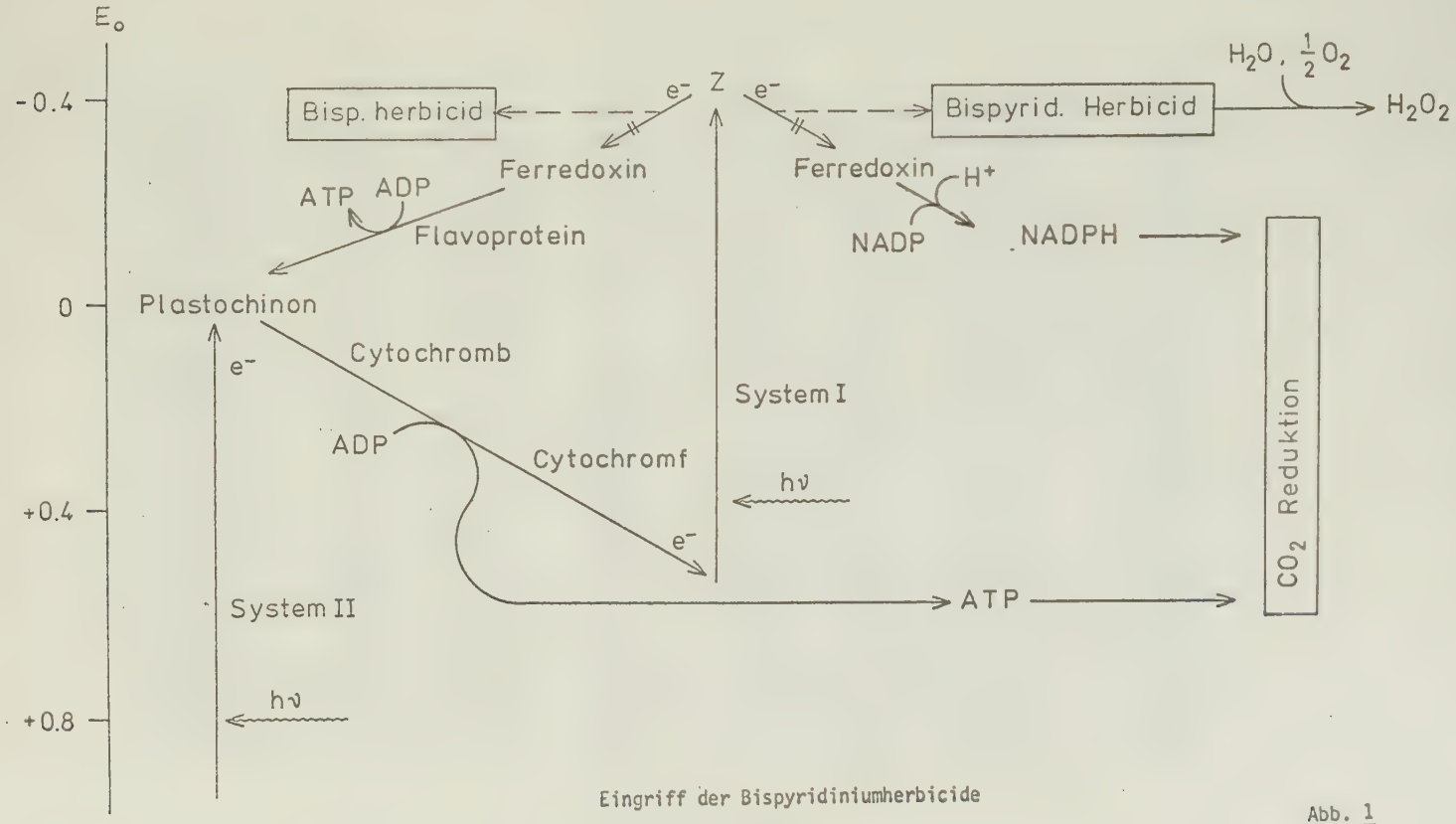

Das Redoxpotential der wirksamen Verbindungen liegt zwischen -300 und -500 mV (15). Die herbicide Wirksamkeit beruht auf einer Substitution des Ferredoxins, das ein Redoxpotential von $E'_0$ = -430 mV besitzt (16).

$$\text{Ferredoxin (red.)} + \text{NADP} \xrightarrow[\text{Reduktase}]{\text{NADP}} \text{Ferredoxin (ox.)} + \text{NADPH}_2$$

Die Blockierung dieses Schrittes nimmt der Pflanze ihre Energiequelle, da der letzte Schritt der Photosynthese unterbrochen wird (Abb. 1). Das Bispyridiniumradikal wird unter Bildung von phytotoxischem Wasserstoffperoxid erneut oxidiert, so daß bereits katalytische Mengen ausreichen, um eine Pflanze abzutöten (17, 18).

Erst im Boden erfolgt eine Inaktivierung des Herbicids durch die Bildung unlöslicher Salze mit Humussäuren oder Absorption an Mineralien und anschließende bakterielle Zersetzung (19). Außerdem sind die Herbicide dieser Klasse in der Lage, bereits gebildetes $NADPH_2$ zu oxidieren.

Diese Theorie des Wirkmechanismus erklärt auch die geringere Aktivität von 2,2'Bispyridiniumsalzen, bei denen die quaternisierende Brücke aus mehr als zwei Gliedern besteht. In diesen

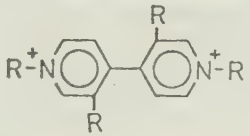



Eingriff der Bispyridiniumherbicide in die Photosynthese

Abb. 1

Verbindungen liegt durch Ausbildung eines Sieben- oder Achtringes keine Coplanarität mehr vor. Dadurch wird die Reduktion zum Radikal erschwert, das Redoxpotential liegt über -500 mV. Darin liegt auch die Unwirksamkeit des 3,3'substituierten Viologens (XXI) und der anderen oben beschriebenen inaktiven Substanzen begründet.

XXI



Diese Substanzen sind also nicht mehr in der Lage, Ferredoxin zu substituieren. In diesem Zusammenhang ist auch der Einfluß der Substituenten bei den 4,4'Bispyridiniumverbindungen von großer Wichtigkeit. Durch sie werden physiologische Faktoren, z.B. die Resorption, wesentlich beeinflußt. So liegt das Redoxpotential von Methylviologen bei $E_o$= -359 mV, das der Verbg. (XV) bei $E_o$= -318 mV. Der Theorie zufolge müßte also auch das Benzylviologen eine herbicide Wirkung besitzen. Da diese jedoch nicht nachweisbar ist, muß der Grund hierfür im veränderten Penetrationsverhalten liegen.

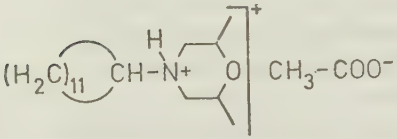
Damit eine quartäre Bispyridiniumverbindung als Herbicid wirksam werden kann, müssen also zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Ein Redoxpotential zwischen $E_o$= -300 und -500 mV und die Möglichkeit, in den Chloroplasten, den Sitz der Photosynthese, zu gelangen.

Die ständig steigende Verbreitung dieser Herbicide in den letzten zwei Jahrzehnten brachte auch eine Zunahme der Intoxikationen bei unsachgemäßer Anwendung (20, 21) mit sich. Insbesondere bei Paraquataufnahme des unverdünnten Handelspräparates traten zahlreiche Vergiftungsfälle mit oft letalem Ausgang auf (22 - 30). Über Analytik und einige bis dahin bekannte toxikologische Daten berichtete K.H. Beyer (31).

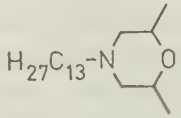
Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Analytik von Diquat und Morfamquat und versucht toxikologische Daten zu liefern, die zur Klärung des Wirkungsmechanismus bei Intoxikationen mit quartären Bispyridiniumverbindungen beitragen sollen.

Als Fungicide finden die beiden Morpholinderivate Dodemorph und Tridemorph Verwendung. Dodemorph ist das N-Cyclododecyl-2,6-dimethyl-morpholinium-acetat (XXII), Tridemorph das N-Tridecyl-2,6-dimethylmorpholin, sein Handelsname lautet Calixin® (XXIII).

XXII

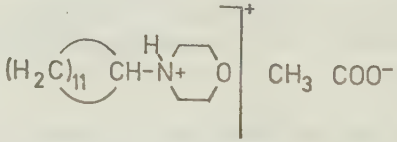


XXIII



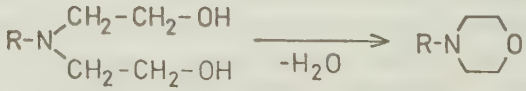
In dieser Entwicklungsreihe der BASF war das Dodacin, das N-Cyclododecyl-morpholinium-acetat (XXIV), der erste Vertreter.

XXIV

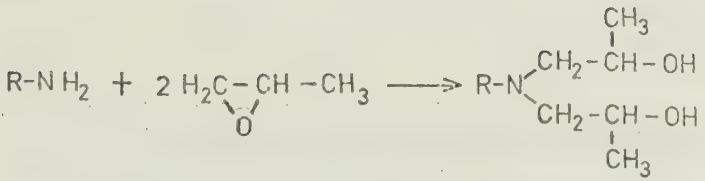


Die Synthese (32) dieser Morpholinderivate erfolgt z.B. durch dehydratisierende Cyclisierung der entsprechenden Bis-(2-hydroxyalkyl)-amine (XXV).

XXV



Die Einführung der 2,6-Methylgruppen kann folgendermaßen erfolgen (33):



König und Mitarbeiter (34) stellten 1965 die Wirksamkeit von Morpholinen mit längeren N-ständigen, cyclischen oder geradkettigen Alkylresten gegen verschiedene Mehltauarten fest. Dabei zeigte sich, daß die Übergänge zwischen Fungicid und Fungistaticum wie bei den Arzneimitteln zwischen Bactericid und Bacteriostaticum fließend sind.

Zum Einsatz kommt das Dodemorph im Zierpflanzenanbau. Es ist, wie auch das Dodacin, gegen Sphaerotheca pannosa, den Rosenmehltau wirksam. Im Test zeigte Dodemorph auch fungicide Eigenschaften bei Erysiphe cichoracearum, dem echten Gurkenmehltau. Das Tridemorph wird im Getreideanbau verwendet. Bei einer Dosierung von 0,75 l/ha wirkt es gegen Erysiphe graminis, den Getreidemehltau.

Für beide Substanzen waren vorsorglich Verfahren zu erarbeiten, die dem Toxikologen eine schnelle quantitative Bestimmung ermöglichen. Die Toxicität beider Verbindungen ist verhältnismäßig gering. So liegt die $LD_{50}$ bei peroraler Verabfolgung des Dodemorph bei einem 50% Präparat bei 4,8 ml/kg Ratte. Tridemorph besitzt eine $LD_{50}$ des technischen Wirkstoffes von 1 ml/kg (35). Beide Präparate rufen nicht sensibilisierende Haut- und Schleimhautreizungen hervor, die symptomatisch behandelt werden.

## II. Allgemeiner Teil

### 1. Quantitative Diquatbestimmung aus biologischem Material

Die quantitative Bestimmung des Diquat aus Körperflüssigkeiten, Gewebe und Exkrementen sollte schnell durchführbar sein. Zugleich mußte sie ohne großen Geräteaufwand die Erfassung geringster Mengen ermöglichen.

Diquat wird durch folgende Daten und Eigenschaften charakterisiert:

Chem. Name: a) Äthylen-dipyridinium-dibromid (Monohydrat)
b) 6,7-Dihydro-dipyrido (1,2-a:2',1'-c)
pyradiziinium-dibromid (Monohydrat)

Summenformel: $C_{12}H_{14}Br_2N_2O$

Molekulargewicht: 362,1

Schmelztemperatur: 335-340° C (36)

Redoxpotential: $E'_o$= -342 mV (14), $E_o$= -349 mV (37)

Schwach grüne, geruchlose Kristalle. In Wasser sehr gut löslich, in polaren organischen Lösungsmitteln schwach löslich, in unpolaren unlöslich. Saure Lösungen sind beständig, im Alkalischen erfolgt Zersetzung.

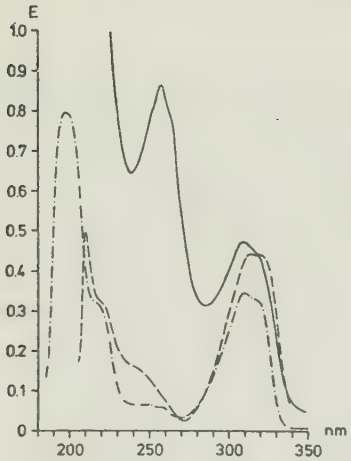
Handelspräparat: Reglone (20 % Diquat Kation)[+)]
Duanti (2,5 % Diquat Kation zusammen mit Paraquat 2,5 % Kation)[+)]

Bevor eine geeignete Isolierungsmethode erarbeitet werden konnte, mußten Meßmethoden für die quantitative Erfassung aufgestellt werden. Hierzu boten sich folgende Möglichkeiten an:

a) direkte Messung im UV-Bereich
b) photometrische Bestimmung des grünen Radikals
c) Bildung eines anderen Farbstoffkomplexes
d) quantitative Bestimmung des Radikals mit Hilfe der ESR Spektroskopie

[+)] Celamerck GmbH/Ingelheim

UV-Spektrum des Diquat




———— pH 10

--------- pH 4,4
(ges. $NH_4$-Cl-Lösung)

-.-.-.-.- pH 7

Abb. 2

Abbildung 2 zeigt das UV-Spektrum von Diquat in verschiedenen pH-Bereichen mit Wasser und gesättigter Ammonchloridlösung.

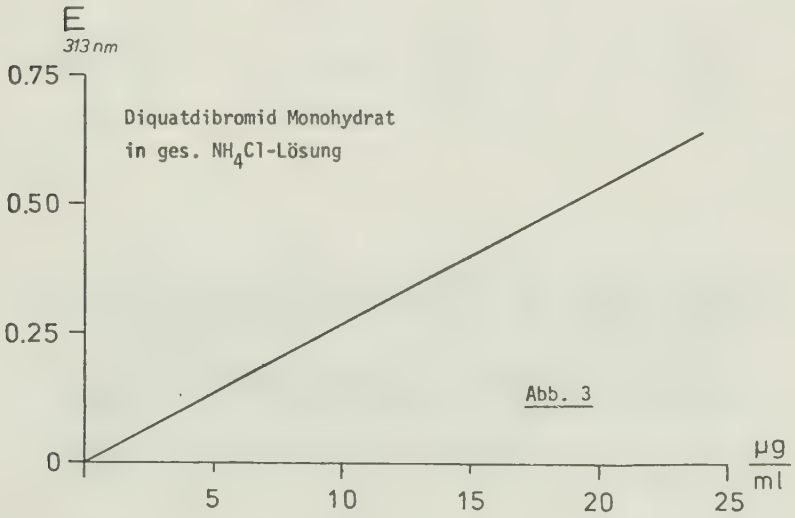
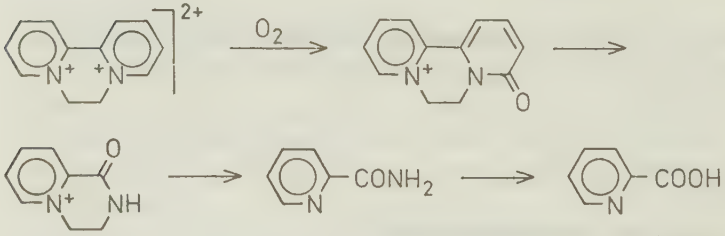



Abb. 3

Für die Eichgerade in Abbildung 3 wurde gesättigte Ammonchloridlösung mit einem pH von 4,4 als Aufnahmemedium für Diquat verwendet.

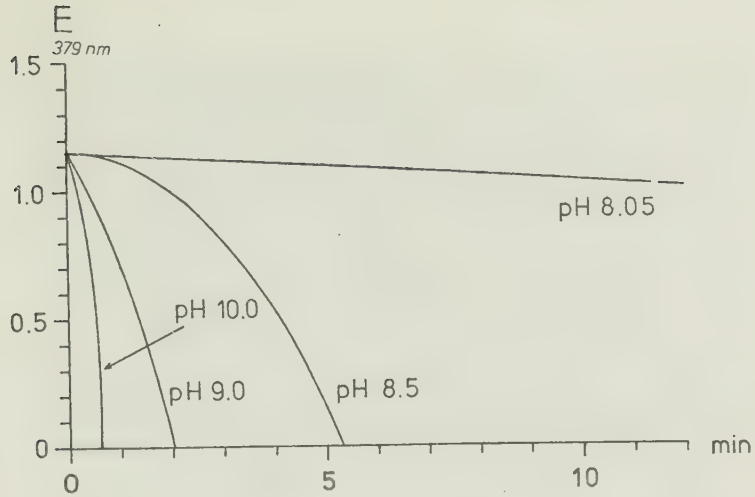
Zur Bestimmung des Paraquat benutzte K.H. Beyer (31) 1 % $Na_2S_2O_4$ gelöst in 1n NaOH. Der Versuch, Diquat mit dieser Lösung zum stabilen Radikal zu reduzieren, mißlang. Während das Paraquatradikal unter diesen Bedingungen über 30 Minuten lang haltbar war und außerdem nach Zusatz von weiterem Reduktionsmittel beliebig oft gebildet werden konnte, zersetzte sich das Diquatradikal bereits nach einer halben Minute merklich. Im Gegensatz zum Paraquat, bei dem lediglich ein Wechsel zwischen reduzierter, farbiger und oxidierter, farbloser Form vorliegt, handelt es sich beim Diquat um einen Abbau im alkalischen Medium (38). Dieser führt über das Monopyridon (XXVI) zuletzt zur Picolinsäure (XXVII).

XXVI



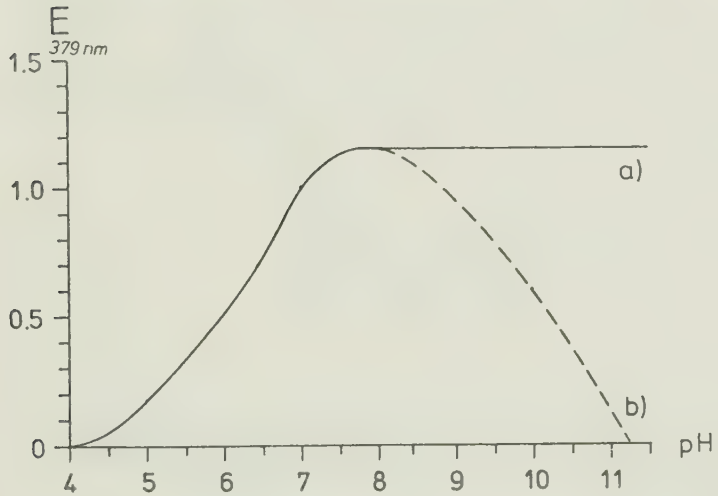

XXVII

Zur Ermittlung optimaler Bedingungen untersuchte ich daher die Abhängigkeit der Stabilität und der Radikalkonzentration in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 4, 5). Die Bedingungen mußten zudem so gewählt werden, daß eine maximale Konzentration an Radikal erreicht wurde, eine Weiterreduktion jedoch nicht ein-




Stabilität des Diquatmonoradikals in Abhängigkeit vom pH-Wert; $O_2$-Gehalt der Lösung 275/uMol/l

Abb. 4



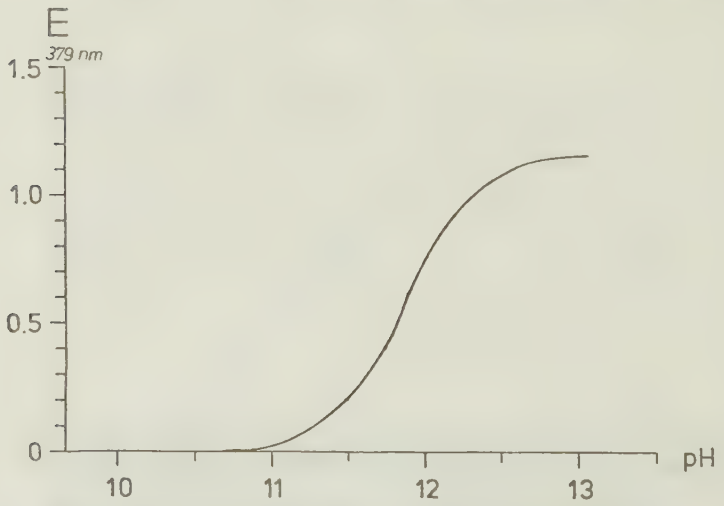

Intensität des Diquatmonoradikals in Abhängigkeit vom pH-Wert

a) sauerstofffreie Lösung b) 275/uMol $O_2$/l

Extinktionsmessung nach 0,5 Min.

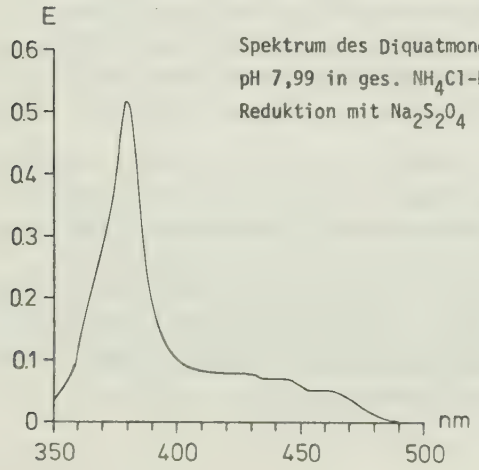
Abb. 5

trat. Zink, das diese Bedingung ebenfalls erfüllt, wurde von mir auf seine Eignung geprüft. Es hat gegenüber $Na_2S_2O_4$ ein nagativeres Redoxpotential ($E_o$ = -760 mV) (39). Das hat den Vorteil, daß Diquat bereits im sauren und neutralen Bereich reduziert wird. Dadurch konnte ich eine Erhöhung der Radikalstabilität erzielen. Wegen der Schwierigkeit, überschüssiges Zink aus der Meßlösung unter Luftabschluß zu entfernen, wurde es von mir jedoch nicht weiter zur quantitativen Bestimmung verwendet. Ascorbinsäure erwies sich als zu schwaches Reduktionsmittel. Gemäß der Nernstschen Gleichung muß die Wasserstoffionenkonzentration erniedrigt werden, um die Reduktionswirkung zu verstärken. Ascorbinsäure war erst ab pH 11 in der Lage, Diquat zu reduzieren (Abb. 6). In diesem Bereich ist es aber bereits so instabil, daß nur unter vollständigem $O_2$ Ausschluß gearbeitet werden konnte. Aus diesem Grunde wurde schließlich Natriumdithionit als Reduktionsmittel benutzt.



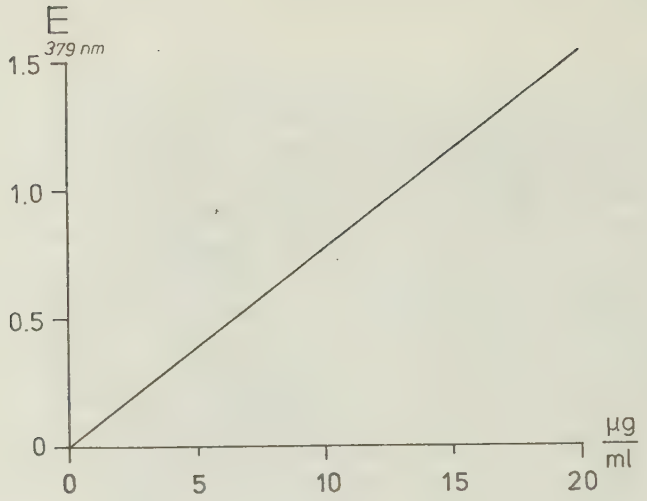

Reduktion des Diquat zum Monoradikal mit Ascorbinsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert (sauerstofffreie Lösung) Abb. 6

Die optimalen Bedingungen liegen dabei um pH 8. In diesem Bereich wird bereits die größte Extinktion erreicht, andererseits ist die Zersetzungsgeschwindigkeit unbedeutend. Aus diesem Grunde ist die Verwendung von 0,5 n NaOH als Lösungsmittel für $Na_2S_2O_4$ der von 0,3 n NaOH, wie sie die DFG Bestimmungsmethode (36) vorschreibt, vorzuziehen. Mit 0,5 n NaOH wird mit dem im folgenden beschriebenen Elutionsmittel (gesättigter $NH_4Cl$ Lösung) ein pH von 7,99 erreicht, mit 0,3 n NaOH ein Wert von 7,65. Meine Messungen mit der Sauerstoffelektrode zeigten, daß durch Natriumdithionit zuerst Sauerstoff aus der Lösung entfernt wird. Danach erfolgt die Reduktion des Diquat zum Radikal. Befindet sich genügend überschüssiges Natriumdithionit in der Lösung, so läßt sich beim Einblasen von Sauerstoff sogar bei pH 10 keine Extinktionsänderung feststellen. Erst nach Verbrauch des Reduktionsmittels erfolgt schlagartig Oxidation und anschließende Zersetzung. Dies begründet die Verwendung von 1 % Natriumdithionit gegen 0,2 % bei der DFG Vorschrift. Abbildung 7 und 8 zeigen unter den erarbeiteten Bedingungen das Spektrum des Diquatmonoradikals im sichtbaren und UV-Bereich und die Eichgerade bei 379 nm.




Spektrum des Diquatmonoradikals bei pH 7,99 in ges. $NH_4Cl$-Lösung nach Reduktion mit $Na_2S_2O_4$

Abb. 7




Eichgerade zur Bestimmung des Diquatdibromid Monohydrat durch Reduktion mit $Na_2S_2O_4$

Abb. 8

Russische Autoren (40) beschrieben die Möglichkeit, Diquat aus wässrigen Lösungen zu bestimmen. Nach Umsetzung mit Chloramin T entsteht mit Chlorphenolrot ein Farbstoffkomplex, der photometrisch bestimmt wird. Dieser erwies sich jedoch gegenüber der oben angegebenen Methode als weit weniger empfindlich. Da er zudem wasserlöslich war und sich mit organischen Lösungsmitteln nicht ausschütteln ließ, konnte er auch bei der Isolierung aus biologischem Material keine Verbesserung bringen.

Versuche, die ESR-Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung kleiner Diquatmengen heranzuziehen, gelangen mir nicht. Die Empfindlichkeit erwies sich der photometrischen Methode nicht als überlegen. Eine direkte Messung aus der wässrigen Phase nach Reduktion des Diquat mit Natriumdithionit zum Radikal wurde durch den starken Untergrund unmöglich gemacht. Lediglich ein zur qualitativen Erkennung geeignetes Signal war

festzustellen. Das Monoradikal besitzt auch als einwertiges Kation noch ausgeprägte hydrophile Eigenschaften und ließ sich mit unpolaren Lösungsmitteln nicht ausschütteln. Als einziges polares Lösungsmittel eignete sich Dichlormethan. Damit ließ sich das mit Zink zum Radikal reduzierte Diquat in höheren Konzentrationen teilweise in die organische Phase überführen.

Nachdem die günstigste photometrische Meßmethode für Diquat festgelegt worden war, sollte das geeignetste Isolierungsverfahren erarbeitet werden. Die große Wasserlöslichkeit machte ein Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln unmöglich. Die Aufarbeitung des Diquat aus dem wässrigen Rückstand des Stas-Otto Ganges oder der Trennung nach Bradford und Bracket (41), die eine Entfernung von Begleitstoffen ermöglicht hätte, war bei der Alkaliempfindlichkeit des Diquat nicht möglich. Auch die Wasserdampfdestillation blieb erfolglos. Eine gaschromatographische Erfassung des erst bei 345° C unter Zersetzung schmelzenden quartären Salzes war unmöglich. Auch meine Versuche einer Bestimmung über die Zersetzungsprodukte mit Dexil 300 GC als Säulenmaterial, das eine Betriebstemperatur von über 400° C ermöglicht, blieben erfolglos. Die Schwierigkeiten bei der Anreicherung des Diquat und die Abtrennung von anorganischen Salzen ließen weitere Arbeiten in dieser Richtung sinnlos erscheinen.

Folgende Möglichkeiten wurden danach eingehend untersucht: Säulenchromatographische und dünnschichtchromatographische Trennung sowie Anreicherung und Abtrennung mit Ionenaustauschern.

Bereits K.H. Beyer berichtete über Versuche einer säulenchromatographischen Trennung des Paraquat mit Celite 545 (31). Diese Arbeiten wurden mit Diquat fortgeführt und erweitert. Als Füll-

material dienten außerdem Silikagel 254 und Bentonit. Letzteres wurde gewählt, da die Inaktivierung von Paraquat und Diquat über die Adsorption an den Erdboden verläuft (14) und Bentonit als Adsorbens bei Vergiftungen mit Bispyridiniumverbindungen empfohlen wird (42). Das für ein quantitatives analytisches Verfahren geeignete Material hätte folgende Bedingungen erfüllen müssen: Bei vollständiger Adsorption von Diquat Abtrennung von körperpflichtigen Begleitstoffen. Anschließend quantitative Freigabe des Herbicids an eine begrenzte Menge Elutionsmittel. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen mit wässrigen Diquatlösungen, Blut und Urin mit Herbicidzusatz zeigen die Tabellen 1 - 10.

aufgegeben:

| Säulenmaterial | 50 ml $H_2O$ | 100 ml $H_2O$ | 200 ml $H_2O$ | 500 ml $H_2O$ | 10 ml Blut + 90 ml $H_2O$ | 50 ml Urin + 150 ml $H_2O$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Silikagel 254 | 13,0 | 27,8 | 51,0 | 90,0 | 27,0 | 51,3 |
| Celite 545 | 10,5 | 27,0 | 50,8 | 91,0 | 26,5 | 51,1 |
| Bentonit | -- | 0,3 | 0,5 | 0,6 | 0,4 | 0,4 |

Die aufgegebenen Mengen wurden mit 2 mg Diquatdibromid versetzt.
Zahlenangaben = % Diquatdibromid in durchgelaufener Flüssigkeit.

Tabelle 1

Säulenmaterial: Silikagel 254

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 25 | 7,3 | 3,5 | 3,8 | 4,1 | 1,6 | 1,4 |
| 26 - 50 | 23,2 | 9,3 | 10,4 | 12,4 | 7,7 | 7,5 |
| 51 - 75 | 21,7 | 12,1 | 12,8 | 16,0 | 8,5 | 8,1 |
| 76 - 100 | 11,7 | 13,7 | 14,9 | 17,5 | 10,3 | 8,8 |
| 101 - 125 | 4,6 | 14,6 | 15,0 | 17,2 | 9,1 | 8,9 |
| 126 - 150 | 1,2 | 4,2 | 5,7 | 2,9 | 4,1 | 4,1 |
| insgesamt | 69,7 | 57,4 | 63,6 | 70,1 | 41,3 | 38,8 |

Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Aufgegeben: 2 mg Diquatdibromid/100 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 2

Säulenmaterial: Celite 545

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 25 | 7,4 | 3,3 | 3,7 | 3,9 | 1,4 | 1,2 |
| 26 - 50 | 25,7 | 9,0 | 10,5 | 12,1 | 7,3 | 6,9 |
| 51 - 75 | 20,2 | 12,2 | 13,3 | 15,9 | 9,1 | 7,9 |
| 76 - 100 | 11,3 | 15,1 | 15,2 | 17,1 | 9,8 | 9,3 |
| 101 - 125 | 4,6 | 13,9 | 16,5 | 17,5 | 10,7 | 10,8 |
| 126 - 150 | 1,0 | 4,6 | 5,6 | 2,8 | 4,7 | 4,6 |
| insgesamt | 70,2 | 58,1 | 64,8 | 69,3 | 43,0 | 40,7 |

Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Aufgegeben: 2 mg Diquatdibromid/100 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 3

Säulenmaterial: Bentonit

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | 20% HCl 95° C | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $NH_4Cl$ 95° C | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 25 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 26 - 50 | 3,9 | 6,4 | -- | -- | -- | -- | 2,1 | 1,7 |
| 51 - 75 | 4,0 | 7,3 | -- | -- | -- | 1,3 | 2,5 | 1,9 |
| 76 - 100 | 3,8 | 7,9 | -- | -- | -- | 1,2 | 2,4 | 1,6 |
| 101 - 125 | 3,9 | 9,6 | -- | -- | -- | 1,4 | 2,4 | 1,9 |
| 126 - 150 | 3,7 | 10,4 | -- | -- | -- | 1,2 | 2,6 | 2,0 |
| insgesamt | 19,3 | 41,6 | -- | -- | -- | 5,1 | 12,0 | 9,1 |

Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Aufgegeben: 2 mg Diquatdibromid/100 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 4

Säulenmaterial: Silikagel 254

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 50 | 19,5 | 16,3 | 16,0 | 19,9 | 12,6 | 11,6 |
| 51 - 100 | 19,7 | 16,9 | 17,2 | 19,6 | 12,5 | 13,7 |
| 101 - 150 | 7,8 | 9,3 | 9,7 | 7,8 | 8,3 | 8,7 |
| insgesamt | 47,0 | 42,5 | 42,9 | 47,3 | 33,4 | 34,0 |

Säulenmaterial: Celite 545

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 50 | 18,8 | 16,9 | 17,3 | 18,9 | 12,4 | 14,2 |
| 51 - 100 | 18,9 | 17,8 | 18,4 | 18,4 | 12,5 | 12,3 |
| 101 - 150 | 9,3 | 7,5 | 7,6 | 9,1 | 8,2 | 8,8 |
| insgesamt | 47,0 | 42,3 | 43,4 | 46,4 | 33,1 | 35,3 |

Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Aufgegeben: 2 mg Diquatdibromid/50 ml Urin + 150 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 5 + 6

Säulenmaterial: Bentonit

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | 20% HCl 95° C | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $NH_4Cl$ 95° C | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 50 | 3,6 | 6,5 | -- | -- | -- | -- | 1,9 | 1,4 |
| 51 - 100 | 8,1 | 15,1 | -- | -- | -- | 2,1 | 4,6 | 3,9 |
| 101 - 150 | 7,7 | 19,2 | -- | -- | -- | 3,3 | 5,0 | 3,7 |
| insgesamt | 19,4 | 40,8 | -- | -- | -- | 5,4 | 11,5 | 9,0 |

Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Aufgegeben: 2 mg Diquatdibromid/50 ml Urin + 150 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 7

Säulenmaterial: Silikagel 254

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 50 | 29,9 | 12,9 | 14,1 | 16,3 | 9,2 | 8,8 |
| 51 - 100 | 32,5 | 26,3 | 27,1 | 33,1 | 18,6 | 16,7 |
| 101 - 150 | 5,7 | 18,9 | 21,6 | 19,6 | 13,2 | 13,4 |
| insgesamt | 68,1 | 58,1 | 62,8 | 69,0 | 41,0 | 38,9 |

Säulenmaterial: Celite 545

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 50 | 33,3 | 12,3 | 14,1 | 15,9 | 8,7 | 7,9 |
| 51 - 100 | 32,1 | 27,4 | 28,1 | 33,7 | 18,8 | 16,5 |
| 101 - 150 | 5,9 | 18,8 | 22,0 | 21,0 | 14,9 | 13,4 |
| insgesamt | 71,3 | 58,5 | 64,2 | 70,6 | 42,4 | 37,8 |

Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Aufgegeben: 2 mg Diquatdibromid/10 ml Blut + 90 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 8 + 9

Säulenmaterial: Bentonit

| Elutionsmittel ml | konz. HCl | 20% HCl 95° C | NaCl | KCl | $NH_4Cl$ | $NH_4Cl$ 95° C | $CaCl_2$ | $MgSO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 50 | 3,8 | 6,5 | -- | -- | -- | 0,3 | 2,0 | 1,5 |
| 51 - 100 | 7,9 | 15,0 | -- | -- | -- | 3,0 | 4,9 | 4,0 |
| 101 - 150 | 8,2 | 19,6 | -- | -- | -- | 3,4 | 5,2 | 3,2 |
| insgesamt | 19,9 | 41,1 | -- | -- | -- | 6,7 | 12,1 | 8,7 |

Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Aufgegeben: 2 mg Diquatdibromid/10 ml Blut + 90 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 10

Wie Tabelle 1 zeigt, besaßen Silikagel 254 und Celite 545 nur eine ungenügende Fähigkeit, Diquat zu adsorbieren. Mit steigender Wassermenge wird es im Durchlauf in erhöhter Konzentration gefunden. Das gleiche gilt für Blut und Urin. Im Gegensatz dazu steht Bentonit. Hier lag beinahe vollständige Adsorption vor. Bei der Elution mit verschiedenen Flüssigkeiten zeigten konz. Salzsäure und gesättigte Ammonchloridlösung die besten Werte bei Silikagel 254 und Celite 545. Mit diesen Elutionsmitteln wurde fast das gesamte, noch auf der Säule befindliche Diquat abgelöst. Wie die 25 ml umfassenden Fraktionen zeigen, sind dazu

150 ml erforderlich. Bentonit gab mit dieser Menge an 95° C warme 20 % Salzsäure nur 40,8 % Diquat ab.

Celite 545 und Silikagel 254 sind also auf Grund ihrer ungenügenden Trennfähigkeit für die quantitative Bestimmung kleiner Diquatmengen schlecht geeignet, bei Bentonit erfolgt wegen zu starker Adsorptionskräfte mit kleineren Mengen Elutionsmittel keine ausreichende Desorption.

Eine dünnschichtchromatographische Trennung wurde für Silikagel 254 F Platten erarbeitet. Zur Vorreinigung wurden Blut und Urin, denen Diquat zugesetzt war, mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Danach wurde am Rotationsverdampfer bis auf 2 ml eingeengt. Von diesen wurden 0,2 ml zur DC-Reinigung eingesetzt. Die Trennung erfolgte in Fließmittel I oder II. Die Bande, welche Diquat enthielt, wurde abgekratzt und für die photometrische Bestimmung mit Wasser eluiert. Bei dieser Methode wurden zwischen 70 und 80 % der eingesetzten Substanz wiedergefunden.

Steht ein Aminco-Spektralphotometer, das auch eine Messung in optisch dichten Medien gestattet, zur Verfügung, ist eine direkte Bestimmung nach dem Ausschütteln mit Chloroform möglich. Diese Methode wurde zum Teil bei späteren Gewebeuntersuchungen benutzt.

Um eine Steigerung der Ausbeute zu erzielen, wurde von mir mit stark sauren Kationenaustauschern gearbeitet. Als Vorlage dienten die Vorschriften von K.H. Beyer (31) und Radelli und Bosetto (43) zur Paraquatbestimmung, da die DFG Methode für Diquat (36) eine ungenügende Wiederfindungsrate von nur 60 - 70 % besitzt.

| Austauscher | | Merck I | Lewatit SP 1080 | Permutit RS 40 | Permutit RSPF |
|---|---|---|---|---|---|
| Aufgegebene Lösung nach Durchlauf | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Elutionsmittel ges. $NH_4Cl$-Lösung | 0 - 50 ml | 63 | 98 | 98 | 94 |
| | 51 - 100 ml | 21 | 1 | 1 | 3 |
| Elutionsmittel ges. KCl-Lösung | 0 - 50 ml | 55 | 96 | 94 | 90 |
| | 51 - 100 ml | 19 | 1 | 2 | 3 |

Aufgegeben: 1 mg Diquatdibromid/100 ml $H_2O$.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %.

Tabelle 11

| in mg Diquat | 100 ml $H_2O$ | 1000 ml $H_2O$ | 10 ml Blut + 390 ml $H_2O$ | 100 ml Harn + 400 ml $H_2O$ |
|---|---|---|---|---|
| 0,5 | 97,0 | 97,2 | 96,1 | 97,1 |
| 1,0 | 98,0 | 98,3 | 96,8 | 96,9 |
| 1,5 | 98,2 | 98,4 | 96,6 | 97,3 |
| 2,0 | 98,8 | 98,8 | 95,2 | 97,0 |

| in mg Diquat | Faeces 20 ml | Kartoffeln 50 g | Erbsen 50 g |
|---|---|---|---|
| 0,5 | 93,1 | 93,0 | 93,6 |
| 1,0 | 95,0 | 94,7 | 92,4 |
| 1,5 | 95,4 | 94,5 | 95,8 |
| 2,0 | 95,8 | 95,3 | 96,1 |

Zahlenangaben = % Diquat im Elutionsmittel nach Durchlauf
Austauscher: Permutit RS 40
Elutionsmittel: 50 ml gesättigte $NH_4Cl$-Lösung.

Tabelle 12

| in mg Diquat | 100 ml $H_2O$ | 1000 ml $H_2O$ | 10 ml Blut + 390 ml $H_2O$ | 100 ml Harn + 400 ml $H_2O$ |
|---|---|---|---|---|
| 0,5 | 97,6 | 98,0 | 84,7+) | 93,0+) |
| 1,0 | 98,0 | 98,2 | 85,3+) | 92,4+) |
| 1,5 | 98,1 | 97,5 | 84,1+) | 89,2+) |
| 2,0 | 97,3 | 97,9 | 85,6+) | 90,3+) |

Zahlenangaben = % Diquat im Elutionsmittel nach Durchlauf
Austauscher: Lewatit SP 1080
Elutionsmittel: 50 ml gesättigte $NH_4Cl$-Lösung.

+)Austauscher durch Quellung zugesetzt, Aufarbeitung nur durch mehrmaliges Reinigen möglich.

Für Faeces, Kartoffeln und Erbsen konnten keine Werte ermittelt werden, da Austauscher völlig verstopft.

Tabelle 13

Bei den mit $H_2O$ als Lösungsmittel durchgeführten Versuchen (Tab.11) zeigten alle vier verwendeten Austauscher eine vollständige Abtrennung des Diquat aus der aufgegebenen Lösung. Lewatit SP 1080 und Permutit RS 40 waren bei der Elution den anderen Austauschern überlegen. Gesättigte Ammonchloridlösung übertraf dabei Kaliumchloridlösung. Anschließend wurde die Brauchbarkeit beider Aus-

| Tier Nr. | Vorschrift | Urin | Faeces | Blut | insgesamt | % Mittel |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I | Beyer | 8,9 | 28,8 | 0 | 37,7 mg | 53 % |
| | DFG | 9,0 | 28,6 | 0 | 37,6 mg | |
| | Radelli | 8,7 | 28,5 | 0 | 37,2 mg | |
| II | Beyer | 10,0 | 31,4 | 0 | 41,4 mg | 59 % |
| | DFG | 9,9 | 31,8 | 0 | 41,5 mg | |
| | Radelli | 10,1 | 31,6 | 0 | 41,9 mg | |
| III | Beyer | 10,4 | 33,2 | 0 | 43,6 mg | 61 % |
| | DFG | 10,1 | 33,2 | 0 | 43,3 mg | |
| | Radelli | 9,8 | 33,1 | 0 | 42,9 mg | |

Diquatausscheidung bei Ratten (Sprague Dawley ♂ 240 g) nach 2 Tagen (1/2 $LD_{50}$ oral = 70 mg Diquat Dibromid Monohydrat gelöst in 2 ml $H_2O$)

Tabelle 14

| Vorschrift | 50 g künstl. Erde | 50 g Kartoffeln |
|---|---|---|
| Beyer | 49,2 | 93,1 |
| DFG | 82,7 | 91,7 |
| Radelli | 86,5 | 91,9 |

Wiederfingung von 2 mg Diquat nach verschiedener Vorbehandlung in %

Tabelle 15

tauscher für die Abtrennung des Herbicids von organischem Material untersucht (Tabelle 12, 13). Dabei zeigte der gröbere Permutit RS 40 bessere Ergebnisse. Während das Austauscherrohr mit Lewatit SP 1080 leicht verstopfte und durch Quellung undurchlässig wurde, eignete sich das Permutit RS 40 Harz auch für trübe Flüssigkeiten.

Im Gegensatz zur Vorschrift von Beyer für Paraquat (31) läßt die DFG-Vorschrift das Probenmaterial vor Abtrennung durch den Austauscher mit 10 n $H_2SO_4$ fünf Stunden am Rückfluß kochen. Radelli (43) läßt zur Vorbereitung mit einem $H_2SO_4$/HF-Gemisch arbeiten. Eine Begründung dieser Methode findet sich bei Calderbank (44), der dadurch eine Adsorption an Proteine und Polysaccharide beseitigen will. Aus diesem Grunde wurde zwischen den drei Vorschriften eine vergleichende Untersuchung nötig. Um die Bedingungen wirklichkeitsnaher zu gestalten, wurde drei Ratten die halbe $LD_{50}$ (45) mit der Schlundsonde oral gegeben. Die Exkremente wurden über zwei Tage gesammelt. Dann wurden die Ratten getötet und der Diquatgehalt in 2 ml Blut bestimmt (Tabelle 14). Zur Vervollständigung wurden auch Kartoffeln und ein künstlicher Boden aus gleichen Teilen Bentonit und Seesand untersucht (Tabelle 15). Es zeigt sich hierbei kein Unterschied zwischen den Arbeitsvorschriften. Im Blut konnte mit allen drei Methoden kein Diquat nachgewiesen werden. Bei der künstlichen Erde zeigten die Säureauszüge allerdings deutlich bessere Werte. Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die komplizierteren Aufarbeitungen nur bei mineralischen Adsorbentien erforderlich sind.

## 2. Quantitative Morfamquatbestimmung aus biologischem Material

Als dritte der im Handel befindlichen Herbicide der Bispyridiniumklasse sollte auch für Morfamquat (III) eine empfindliche qualitative Restimmungsmethode für Rückstände in biologischem Material ausgearbeitet werden.

Morfamquat wird durch folgende Daten und Eigenschaften charakterisiert:

Chem. Name: 1,1'-Di-(3,5-dimethylmorpholino-carbamoyl-methyl)-4,4'-dipyridylium-dichlorid Dihydrat

Summenformel: $C_{26}H_{40}Cl_2N_4O_6$

Molekulargewicht: 575,1

Schmelztemperatur: 303° C (unter Zersetzung) (46)

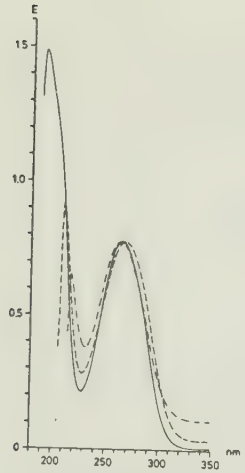
Redoxpotential: $E_0$=-320 mV

Weißes, sich an der Luft unter Zersetzung schwach gelb färbendes Pulver. In Wasser sehr gut löslich, in polaren organischen Lösungsmitteln schwach löslich, in unpolaren unlöslich. Saure Lösungen sind beständig, im Alkalischen erfolgt oberhalb pH 10 Zersetzung.

Handelspräparat: Rasen Primus (20 % Morfamquat Kation) +)

Nachdem sich bei Paraquat und Diquat photometrische Meßmethoden bewährt hatten, wurde auch bei Morfamquat dieser Weg bei der Gehaltsbestimmung eingeschlagen. Abbildung (9) zeigt das UV-Spektrum von Morfamquat in verschiedenen pH-Bereichen. Wie der Vergleich mit Abbildung (10) beweist, liegen auch hier die beiden Bispyridiniumbanden vor. Durch Substitution am Stickstoff erfährt die langwellige Bande (234 nm) eine bathochrome Verschiebung um ca. 30 nm. Diese ist beim Methylviologen geringfügig

+) Celamerck GmbH/Ingelheim



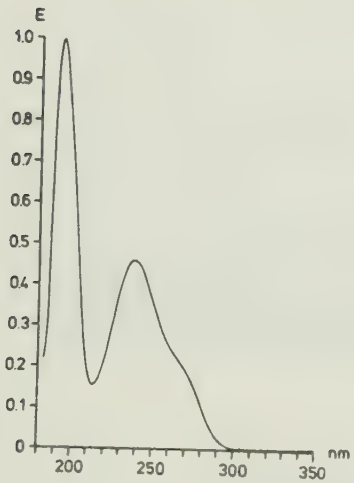

UV-Spektrum des Morfamquat

———— pH 7

---------- pH 4,4 (ges. ($NH_4Cl$-Lösung)

-·-·-·-·-·- pH 12

Abb. 9




UV-Spektrum des 4,4' Bis-pyridins

Abb. 10

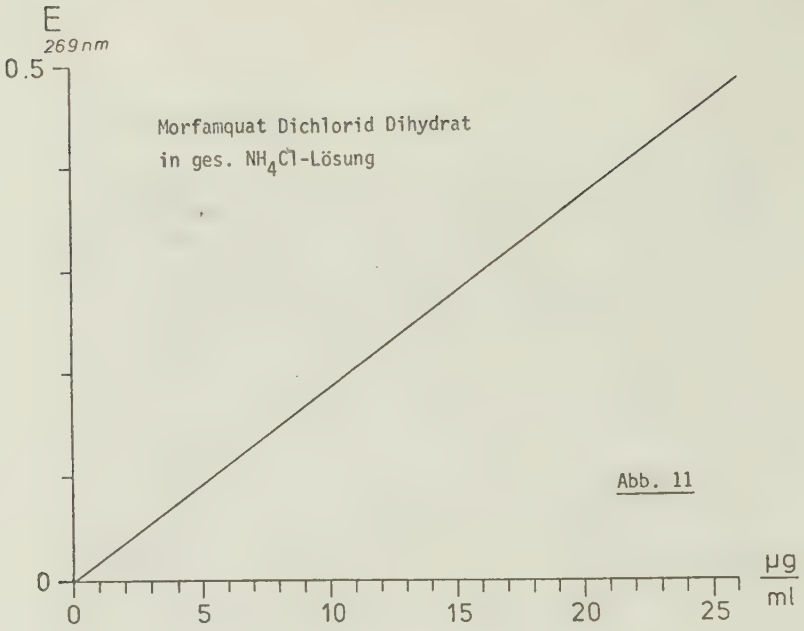
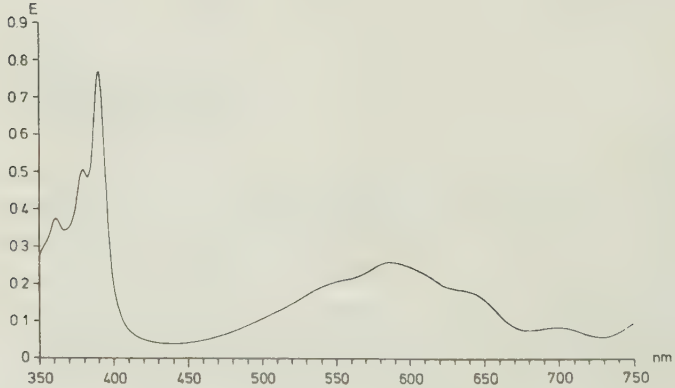



Abb. 11




Spektrum des Morfamquat Monoradikals bei pH 5

Abb. 12

schwächer. Der Einfluß von pH-Wert und Kationenkonzentration ist bei der kurzwelligen, bei 200 nm liegenden Bande besonders stark. Das im Bereich von 265 - 270 nm erscheinende Maximum eignet sich daher zur quantitativen Bestimmung besser, da hier eine weit geringere Abhängigkeit vorliegt. Die Eichgerade in Abbildung (11) ist in gesättigter $NH_4Cl$-Lösung bei pH 4,4 aufgenommen. Da sich diese Gehaltsbestimmung nur für reine Lösungen eignet, wurde wie beim Paraquat die photometrische Auswertung des zum Radikal reduzierten Morfamquat erforderlich. Die Bestimmung des Redoxpotentials ergab für diese Bispyridiniumverbindung einen Wert von $E_0$=-320 mV. Sie ist damit leichter als Paraquat und Diquat zu reduzieren. Zuerst wurde Morfamquat bei pH 5 mit Zink reduziert (Abbildung 12). Das Spektrum des blau gefärbten Radikals entspricht dem des Methylviologens fast völlig. Um den geeigneten pH-Bereich für die Reduktion mit Natriumdithionit zu ermitteln, wurde bei 399 nm die Extinktion in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration bestimmt (Abbildung 13). Dabei zeigte sich wie bei Diquat ein Abfall der Extinktion bei steigendem pH-Wert. Im Gegensatz zur 2,2'Bispyridiniumverbindung trat dieser jedoch auch bei sauerstofffreier Lösung auf. Das Spektrum zeigt hierbei einen Verlust der Maxima bei 399 und 595 nm, dagegen aber ein Ansteigen der Feinstrukturbanden bei 369 und 387 nm (Abbildung 14). Durch Oxidationsmittel wie Jod, Kaliumpermanganat, Dichromat oder Sauerstoff läßt sich das blaue Radikal erneut bilden. Bläst man mit einer Kapillare Sauerstoff in die Meßküvette mit der entfärbten Lösung, so treten die Maxima bei 399 und 595 nm unter Absinken der Banden bei 369 und 387 nm wieder auf. Nach Beendigung der Sauerstoffzufuhrt läuft dieser Vorgang in umgekehrter Richtung ab. Dies läßt sich bis zum Verbrauch des

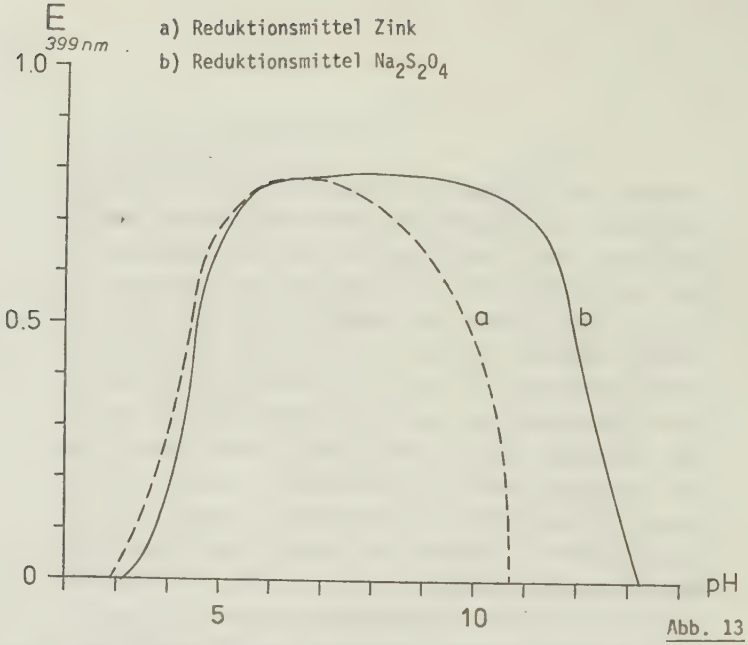
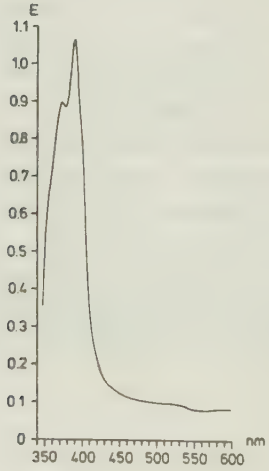



Abb. 13

Intensität des Morfamquatmonoradikals in Abhängigkeit vom pH-Wert; $O_2$-Gehalt bei a und b: jeweils 0 und 275 uMol/l

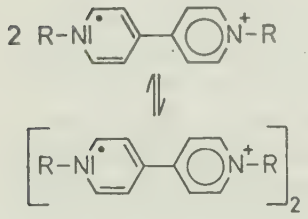


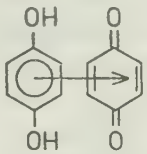

UV-Spektrum des reduzierten Morfamquat bei pH 11

Abb. 14

Reduktionsmittels wiederholen. Danach erscheint das ursprüngliche Morfamquatspektrum. Erneuter Zusatz von Reduktionsmitteln brachte die Wiederholung dieser Vorgänge. Eine Zersetzung des Morfamquat bei pH 12 trat bei Zimmertemperatur nur langsam ein.

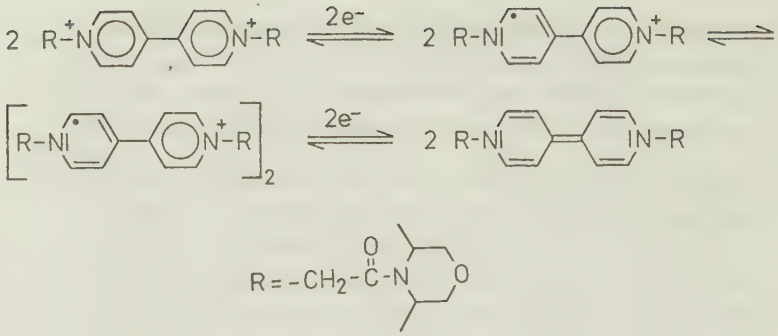
Im pH-Bereich von 8-10 war ein weiteres Phänomen zu beobachten: Während das Maximum bei 369 nm bei den bisherigen Messungen stets kleiner war, als das bei 387 nm, konnte jetzt bei schneller Messung eine Umkehr der Intensitäten festgestellt werden (Abbildung 15). Außerdem war dabei eine Veränderung des Verhältnisses der Extinktionen im Sichtbaren zueinander auffallend. Letztere Beobachtungen stimmen mit denen von Schwarz (47) beim Methylviologen überein. Seine Feststellungen machte er bei elektrochemischer Reduktion von 4,4'Bispyridiniumverbindungen. Das Ansteigen der Bande bei 369 nm erklärt er mit einer Dimerisierung des Viologenradikals. Dieses Dimerisat ist nicht wie das Chinhydron (XXVIII) als Charge-Transfer Komplex aufzufassen, sondern wie folgt zu formulieren:





XXVIII

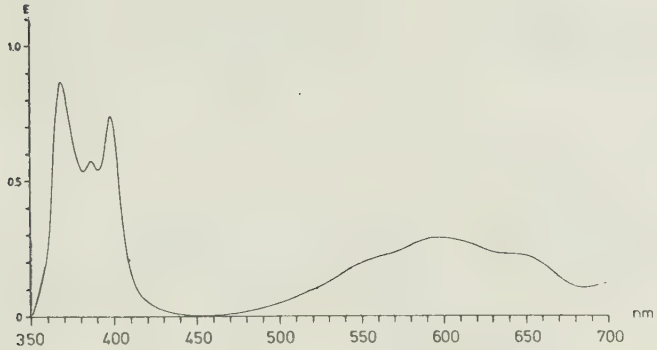
Unter Berücksichtigung dieser Überlegung läßt sich beim Morfamquat folgendes Reduktionsschema formulieren:



Dabei sind die Maxima wie folgt zuzuordnen:

| | | |
|---|---|---|
| 369 nm | Morfamquat | Dihydroderivat |
| 387 nm | " | Monoradikal Dimerisat |
| 399 nm, 595 nm | " | Monoradikal |

Die von Farrington (48) bei Behandlung mit konzentrierten Alkalien beobachtete teilweise Reduktion des Paraquat zum Radikal vor der Zersetzung der Substanz konnte beim Morfamquat ebenfalls festgestellt werden. Oberhalb von pH 12 tritt bei ihm eine starke lila Fluoreszenz ein, die bald in eine braungelbe Farbe übergeht. In äthanolischer Lösung ist diese Fluoreszenz noch ausgeprägter. Erhitzt man die Alkalilauge vor dem Morfamquatzusatz, so tritt intermediär die Farbe des Morfamquatradikals auf. Die Intensität ist allerdings viel schwächer als bei der Reduktion mit Natriumdithionit. Nach Kosower (49) sind dafür möglicherweise Pyridinylradikale verantwortlich, die noch unzersetztes Viologen reduzieren.

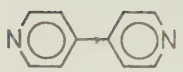


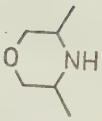

Spektrum im UV und sichtbaren Bereich des Morfamquat-monoradikal-Dimerisats.

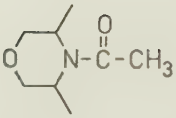
Abb. 15

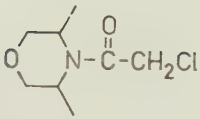
Als Zersetzungsprodukte bei der Behandlung von Morfamquat mit heißer 1 n NaOH wurden von mir die folgenden vier Verbindungen mit Hilfe kombinierter Gaschromatographie und Massenspektrometrie (Abb. 16-19) identifiziert:

1. 4,4´Bispyridin (XXIX)
2. 3,5 Dimethylmorpholin (XXX)
3. Essigsäure-3,5-dimethylmorpholid (XXXI)
4. Chloressigsäure-3,5-dimethylmorpholid (XXXII)

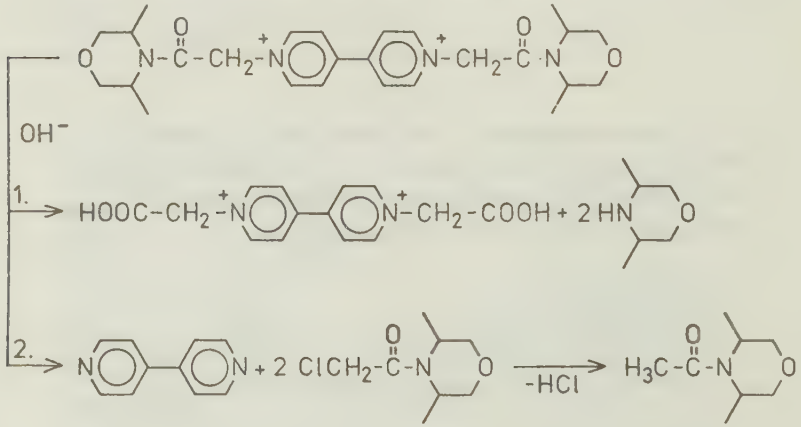
XXIX 

XXX 

XXXI 

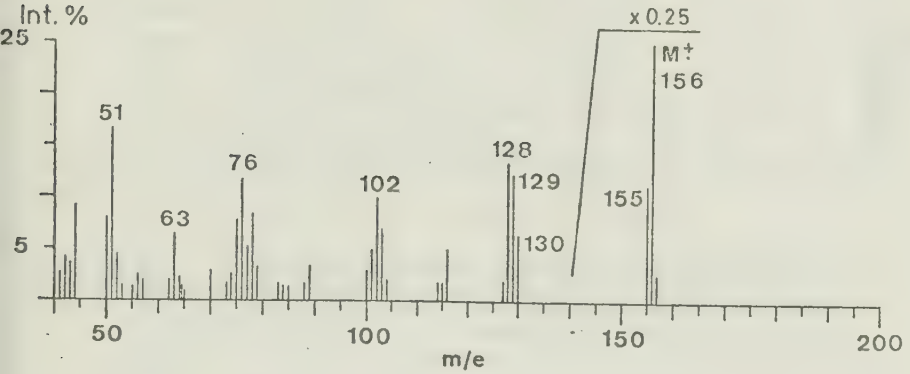
XXXII 

Die einleitenden Schritte der Zersetzung des Morfamquat im Alkalischen lassen sich dann wie folgt formulieren:



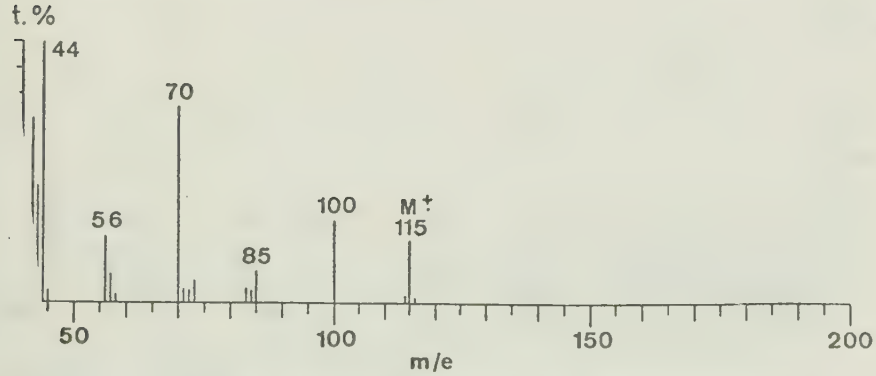

Bei den im Gaschromatogramm darüber hinaus auftretenden Peaks handelt es sich um künstliche, unter den gaschromatographischen

Arbeitsbedingungen entstandene Bruchstücke und deren Polymerisate, deren Massenspektren darauf schließen lassen, daß auf die einleitenden Zersetzungsreaktionen ein Abbau über Pyridone und Pyridincarbonsäuren erfolgt.



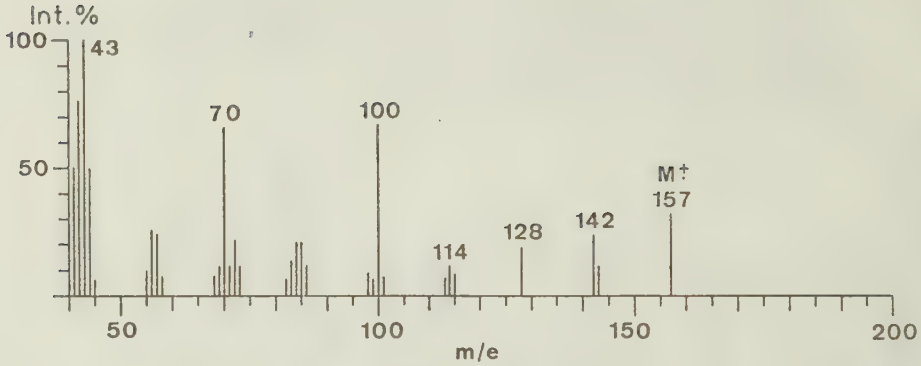

Massenspektrum des 4,4'Bispyridins (XXIX) nach gaschromatographischer Trennung (Säule 2) der Morfamquatzersetzungsprodukte

Abb. 16



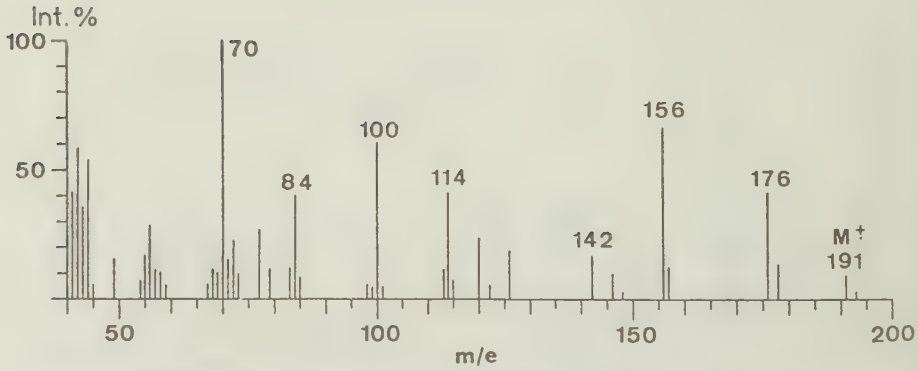

Massenspektrum des 3,5 Dimethylmorpholins (XXX) nach gaschromatographischer Trennung (Säule 2) der Morfamquatzersetzungsprodukte

Abb. 17




Massenspektrum des Essigsäure-3,5-dimethylmofpholids (XXXI) nach gaschromatographischer Trennung (Säule 2) der Morfamquatzersetzungsprodukte

Abb. 18




Massenspektrum des Chloressigsäure-3,5-dimethylmorpholids (XXXII) nach gaschromatographischer Trennung (Säule 2) der Morfamquatzersetzungsprodukte

Abb. 19

Als weiteres Reduktionsmittel wurde Askorbinsäure eingesetzt, um Morfamquat zu reduzieren. Abbildung (20) zeigt die Intensität der 399 nm Bande in Abhängigkeit vom pH-Wert. Der Vorteil der Askorbinsäure liegt demnach darin, daß keine Oberreduktion zu befürchten ist. Allerdings reagiert Vitamin C langsamer als Natriumdithionit. Es zeigt sich, daß neben dem Maximum bei 399 nm auch bei schwächeren Reduktionsmitteln die Maxima bei 369 und 387 nm auftreten. Es gelang nicht, diese voll zu unterdrücken und das Gleichgewicht ganz auf das Monoradikal zu verschieben. Zur quantitativen Auswertung bestehen also hierbei zwei Möglichkeiten:

a) Messung der 399 nm Bande im pH-Bereich bis ca. pH 9
b) Messung des Diradikals bei 387 nm und pH 12.

Da die zweite Methode keine große Empfindlichkeitssteigerung gebracht hätte, wurde die Paraquat und Diquat entsprechende Auswertung vorgezogen. Die Eichgeraden in Abbildung (21) bei 399 und 597 nm sind in gesättigter Ammonchloridlösung nach pH-Einstellung mit Natriumbikarbonat auf 7,5 ermittelt.

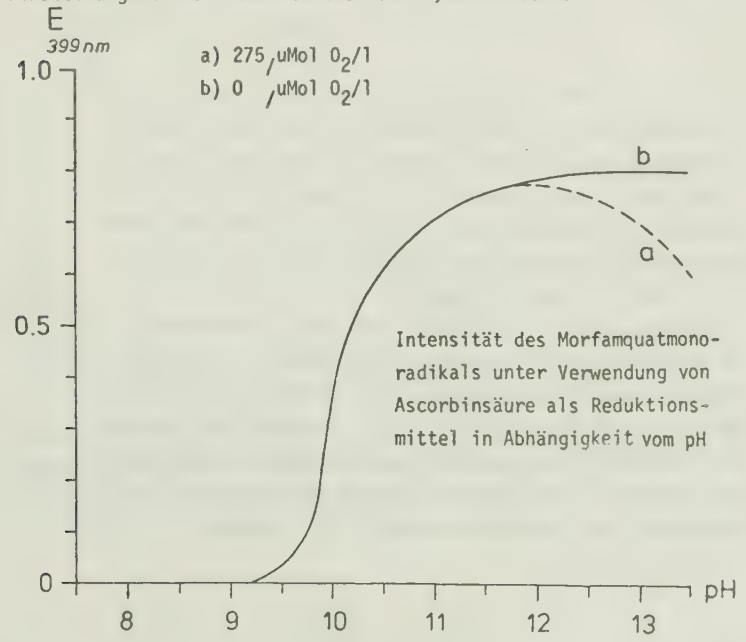
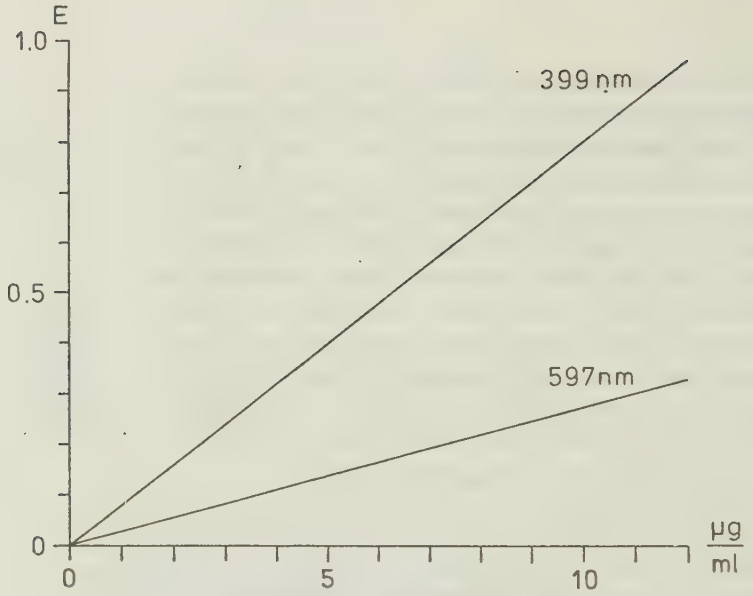





Abb. 20




Eichgeraden zur Bestimmung des Morfamquatdichlorid-Dihydrats durch Reduktion mit $Na_2S_2O_4$

Abb. 21

Zur Isolierung des Morfamquat wurde ähnlich wie beim Diquat mit sauren Ionenaustauschern gearbeitet. Eine Abtrennung mit säulenchromatographischen Methoden wurde nach den Erfahrungen mit Diquat nicht weiter verfolgt. Dünnschichtchromatographische Auftrennung eignet sich ebenso wie bei den vorher beschriebenen Bispyridiniumverbindungen nur bei verhältnismäßig reinen Morfamquatlösungen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach zweimaligem Ausschütteln mit Chloroform zur Abtrennung darin löslicher Stoffe wurde die wässrige Phase am Rotationsverdampfer auf 2 ml eingeengt. 0,2 ml wurden dann zur DC-Trennung eingesetzt. Als Laufmittel eigneten sich die Fließmittel I und II. Nach Elution des Morfamquat vom Kieselgel F 254 erfolgte die quantitative photometrische Auswertung. Auf diesem Wege wurden 65-70 % wiedergefunden.

Bei der Anreicherung und Abtrennung durch Ionenaustausch wurden zunächst wässrige Lösungen verschiedener Konzentration eingesetzt.

| Austauscher ml | Merck st.sauer | Lewatit SP 1080 | Merck sch.sauer |
|---|---|---|---|
| Wasser n.Durchl. | 0 | 0 | 0 |
| 0-50 | 21 | 18 | 30 |
| 51-75 | 9 | 10 | 12 |
| 76-100 | 10 | 8 | 13 |
| 101-150 | 7 | 12 | 9 |
| insgesamt | 47 | 48 | 64 |

| Austauscher ml | Permutit RS 40 | Permutit RSPF | Permutit C 65 |
|---|---|---|---|
| 0-50 | 64 | 64 | 17 |
| 51-75 | 14 | 13 | 9 |
| 76-100 | 12 | 13 | 10 |
| 101-150 | 3 | 4 | 15 |
| insgesamt | 93 | 94 | 51 |

Aufgegeben: 1 mg Morfamquat Dichlorid Dihydrat in 100 ml Wasser; Elutionsmittel: gesättigte $NH_4Cl$-Lösung

Tabelle 16 Wiederfindung bei allen Angaben in %

Während alle Austauscher Morfamquat vollständig abtrennten, gab die Elution mit 50 ml gesättigter $NH_4Cl$-Lösung ungenügende Ergebnisse (Tabelle 16). Die besten zeigten noch Permutit RS 40 und Permutit RSPF, die bei 150 ml Elutionsmittel Morfamquat fast quantitativ abgaben. Diese, schon zur Bestimmung des Diquat mit Erfolg verwendeten Austauscher, wurden für die folgenden Versuche eingesetzt. Um eine bessere Elution zu erreichen, wurde mit konzentrierten Lösungen anderer Kationen, pH-Änderung und Zusatz von organischen Lösungsmitteln gearbeitet (Tabelle 17).

| Elutionsmittel ml | KCl | $BaCl_2$ | $MgCl_2$ | $NH_4Cl$ 1 % $NaHCO_3$ | $NH_4Cl$ 20 % Methanol | $NH_4Cl$ 20 % Tetrahydrofuran |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0-50 | 59 | 24 | 30 | 67 | 22 | 18 |
| 51-75 | 21 | 13 | 14 | 12 | 10 | 11 |
| 76-100 | 11 | 12 | 15 | 11 | 10 | 9 |
| 101-150 | 7 | 16 | 12 | 2 | 7 | 12 |
| insgesamt | 98 | 65 | 71 | 92 | 49 | 50 |

Austauscher: Permutit RS 40
Aufgegeben: 1 mg Morfamquat Dichlorid Dihydrat in 100 ml $H_2O$
Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %

Tabelle 17

Nur die durch Zusatz von 1 % $NaHCO_3$ auf pH 7,5 gebrachte gesättigte $NH_4Cl$-Lösung führte dabei zu leicht verbesserten Werten+). Da beide Austauscherharze nach Herstellerangaben Betriebstemperaturen von über 100° C zulassen, wurde die Elution bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht (Tabelle 18). Sowohl Permutit RS 40, ein Polystyrolharz mit einer Gelstruktur als Matrix und Permutit RSPF, ein makroporöser Austauscher zeigten bei 96° C und $NH_4Cl$-Lösung bei pH 7,5 das beste Ergebnis. Zur Überprüfung der Stabilität des Morfamquat bei diesem pH-Wert wurde es im Elutionsmittel 4 Stunden bei 96° C erhitzt. Es war keine Gehaltsabnahme der Lösung festzustellen. Da sich für trübe Lösungen Permutit RS 40 bei der Diquatbestimmung besser geeignet hatte, wurde er für die weitere Morfamquatbestimmung eingesetzt. Aus Tabelle (19) geht hervor, daß unterschiedliche Morfamquatmengen aus beliebigen Volumina abgetrennt und gleichbleibend gut eluiert werden können. Auch die Abtrennung von Morfamquat aus Citratblut, verschiedenen Harnen und Faeces ergab eine hohe Wiederfindungsrate (Tabelle 20).

+) im Bereich von 0 - 50 ml.

| Elutions-mittel ml | $NH_4Cl$ 96°C | $NH_4Cl$ + $NaHCO_3$ 96°C | $NH_4Cl$ 40°C |
|---|---|---|---|
| 0-50 | 90 | 98 | 80 |
| 51-75 | 6 | 1 | 10 |
| 76-100 | 3 | - | 4 |
| 101-150 | - | - | 1 |

Austauscher: Permutit RS 40

| Elutions-mittel ml | $NH_4Cl$ 96°C | $NH_4Cl$ + $NaHCO_3$ 96°C | $NH_4Cl$ 40°C |
|---|---|---|---|
| 0-50 | 89 | 98 | 81 |
| 51-75 | 5 | 1 | 10 |
| 76-100 | 4 | - | 5 |
| 101-150 | - | - | 1 |

Austauscher: Permutit RSPF

Aufgegeben: 1 mg Morfamquat Dichlorid Dihydrat in 100 ml $H_2O$
Zur Elution mit den angegebenen Salzen wurden bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen verwendet.
Zahlenangaben = Wiederfindung in %

Tabelle 18

| Auftrags-menge in ml | 0,5 mg | 1,0 mg | 1,5 mg | 2,0 mg |
|---|---|---|---|---|
| 100 | 97 | 99 | 96 | 96 |
| 200 | 98 | 98 | 99 | 97 |
| 500 | 99 | 99 | 100 | 98 |
| 1000 | 97 | 99 | 98 | 98 |

Austauscher: Permutit RS 40
Elutionsmittel: ges. $NH_4Cl$-Lösung/1 % $NaHCO_3$ 96° C
Wiederfindung in %

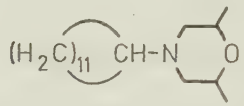
Tabelle 19

| Morfam-quat aus | 0,5 mg | 1,0 mg | 1,5 mg | 2,0 mg |
|---|---|---|---|---|
| Harn | 94 | 94 | 96 | 95 |
| Blut | 93 | 95 | 93 | 93 |
| Faeces | 90 | 91 | 94 | 94 |

Austauscher: Permutit RS 40
Elutionsmittel: ges. $NH_4Cl$-Lösung/1 % $NaHCO_3$ 96° C
Wiederfindung in %

Tabelle 20

3. Quantitative Dodemorphbestimmung aus biologischem Material



Chem. Name: a) N-Cyclododecyl-2,6-dimethyl-morpholin
b) N-Cyclododecyl-2,6-dimethyl-tetrahydro-1,4-oxazin

Summenformel: $C_{18}H_{35}NO$

MG: 281

Schmelztemperatur: 63-65° (freie Base)

Die freie Base ist ein weißes, geruchloses Pulver. Sie ist gut löslich in organischen Lösungsmitteln. In Wasser ist sie unlöslich. Nach Säurezusatz löst sie sich unter Salzbildung.

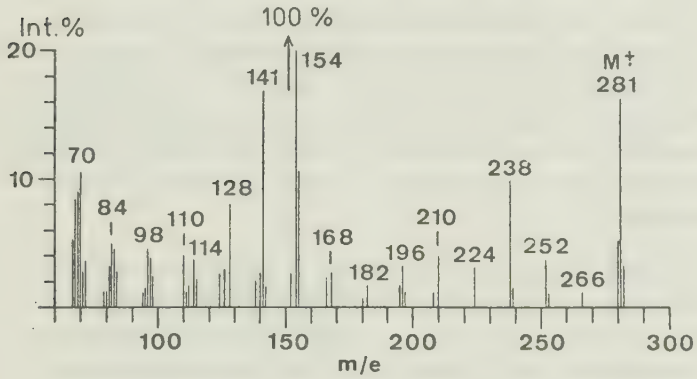
Handelsname: BASF Mehltaumittel (als Acetat)
z.B. im Rosenspritzmittel Blütendank +)

Dodemorph wird in Form des Acetats, das nur in Lösung beständig ist, in den Handel gebracht. Vor der Auswahl eines geeigneten Abtrennverfahrens aus Körperflüssigkeiten wurden qualitative und quantitative Bestimmungsmethoden untersucht.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie läßt sich nach dem Vorschlag der BASF (50) im Laufmittel III eine Identifizierung von Dodemorph nach Ansprühen mit Dragendorffs Reagenz vornehmen.

+) Aglukon GmbH Düsseldorf

In den Laufmitteln I, IV und V zeigte Dodemorph zwei Flecken. Meine Vermutung, daß es sich hierbei um eine Verunreinigung der technischen Substanz handeln könnte, bestätigte sich nicht. Auch nach mehrmaligem Umkristallisieren traten beide Flecken wieder auf. Die Massenspektren beider vom Silicagel mit Chloroform eluierten Substanzen waren identisch (Abb. 22 ). Es handelt sich daher bei den aufgetrennten Verbindungen um Stereoisomere.




Massenspektrum des Dodemorph Abb. 22

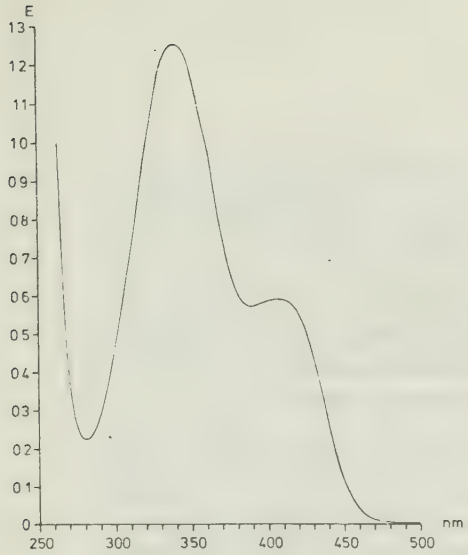
Die quantitative Bestimmung des Dodemorph sollte möglichst auf photometrischem Wege erfolgen. Da die Verbindung weder im sichtbaren noch im UV-Bereich eine Absorption besitzt, mußte diese erst durch eine quantitativ ablaufende Reaktion geschaffen werden. Es wurden dafür folgende Möglichkeiten untersucht:

1.) Dodemorph Methojodid
2.) " Bromthymolblau Komplex
3.) " Eosin Komplex
4.) " Pikrat

Bei der Auswertung des Methojodids wurde in Anlehnung an die Methode von Reis (51) zur Bestimmung kleiner Mengen quaternärer Ammoniumverbindungen vorgegangen. Dabei wurde zunächst Dodemorph-Methojodid in Chloroform gelöst. Nach Zugabe von $H_2SO_4$ und Natriumnitritlösung wurde im Scheidetrichter geschüttelt. Die Färbung des zum Jod oxidierten Jodids wurde bei 490 nm in der Chloroformphase gemessen. Die bei diesem Verfahren ermittelten Werte folgten dem Lambert-Beerschen Gesetz. Der Versuch, in Chloroform gelöstes Dodemorph mit überschüssigem Methyljodid völlig zu quaternisieren, mißlang jedoch. Nach dem Abdestillieren von überschüssigem Reagenz zeigte die anschließende Jodbestimmung nur Umsetzung von 30-50 % der theoretischen Ausbeute.

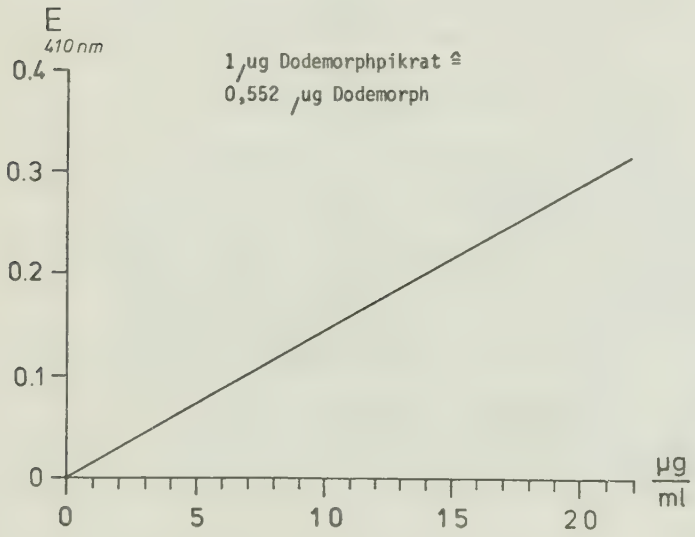
Ruf (52) erarbeitete zur Bestimmung von quaternären Ammoniumverbindungen eine Vorschrift zur photometrischen Erfassung eines Eosinkomplexes. Versuche, diese für Dodemorph abzuwandeln, schlugen fehl. Das gleiche gilt für die Bromthymolblaumethode nach Ballard, Isaac und Scott (53).

Sheiham und Pinford (54) berichten über eine photometrische Bestimmung von Quarts mit Hilfe von Na-Pikratlösung. Ein Mangel dieser Vorschrift war die direkte Umsetzung der Untersuchungsflüssigkeit mit Natriumpikrat ohne vorausgegangene Abtrennung des Amins. Dabei ergaben sich Nebenreaktionen, welche die Meßergebnisse stark verfälschten. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen wurde die Absorptionskurve von festem Dodemorphpikrat gelöst in Chloroform aufgenommen (Abb. 23 ) und die Eichgerade




Spektrum des Dodemorphpikrats im UV und sichtbaren Bereich

Abb. 23




Eichgerade zur Bestimmung des Dodemorph über das Pikrat

Abb. 24

bei 410 nm aufgestellt (Abb. 24). Dieses Maximum wurde dem bei 345 nm vorgezogen, da letzteres stark pH abhängig ist und leicht zu falschen Meßergebnissen führt.

Zur Abtrennung des Dodemorph aus wässrigen Flüssigkeiten vor der Umsetzung mit Pikrinsäure wurden zwei Wege untersucht:

1. Abtrennung durch Ionenaustauscher
2. " " Elution mit Chloroform

Als Ionenaustauscher wurden die Harze Permutit RS 40 (stark sauer und Permutit C 65 (schwach sauer) in der H-Form eingesetzt. Beide hielten zwar das Dodemorph quantitativ zurück, die Elution mit verschiedenen gesättigten Salzlösungen sowie Chloroform (Tabelle 21) war ungenügend. Eine direkte Abtrennung

| | $Na^+$ | $K^+$ | $NH_4^+$ | $CHCl_3$ | Menge Elutionsmittel |
|---|---|---|---|---|---|
| Permutit RS 40 | 4 | 5 | 8 | - | 50 ml |
| | 5 | 5 | 7 | - | 51-100 ml |
| | 7 | 9 | 11 | 3 | 101-200 ml |
| Permutit C 65 | 5 | 6 | 9 | - | 50 ml |
| | 7 | 6 | 13 | - | 51-100 ml |
| | 8 | 9 | 13 | 4 | 101-200 ml |

Aufgegeben: 1 mg Dodemorph/100 ml 0,01 n HCl.
Im Durchlauf war kein Dodemorph nachweisbar.
Wiederfindung in %

Tabelle 21

mit Chloroform erwies sich als schneller und erfolgreicher.

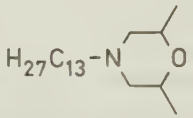
Dazu wurde die wässrige Phase mit 1 n NaOH auf pH 10 gebracht. Es ist dabei darauf zu achten, daß die zu untersuchenden Körperflüssigkeiten zunächst stark verdünnt werden. Nach viermaligem Ausschütteln mit Chloroform werden diese Phasen vereinigt, am Rotavapor eingeengt und mit wässriger gesättigter Pikrinsäurelösung geschüttelt. Das gebildete Dodemorphpikrat löst sich in der Chloroformphase, während die freie Pikrinsäure in der wässrigen verbleibt. Anschließend erfolgt die photometrische Auswertung der Chloroformphase gegen einen Blindwert.

Die quantitative Abtrennung mit Chloroform kann auch mit einem Perforator nach 5 Stunden erreicht werden. Bei diesen Methoden betrug die Erfassungsgrenze 0,2 mg Dodemorph. Die Wiederfindungsrate betrug im Mittel 93 %.

MeineVersuche, die eingeengte Chloroformphase mit Hilfe quantitativer Gaschromatographie direkt zu erfassen, schlugen fehl. Die Elution körperpflichtiger Substanzen verursachte dabei einen so starken Untergrund, daß quantitative Aussagen ohne weitere Aufreinigung der Chloroformphase unmöglich waren.

Bei reinen Dodemorphlösungen konnten gaschromatographisch auf verschiedenen Säulen und bei unterschiedlichen Temperaturen ebenso, wie bei der Dünnschichtchromatographie, immer zwei Substanzen identifiziert werden, was ebenfalls auf das Vorliegen von Isomeren hinweist. Eluiert man die in Laufmittel I, IV oder V getrennten Flecken einzeln, so erhält man im Gaschromatogramm jeweils nur einen Peak.

4. Quantitative Tridemorphbestimmung aus biologischem Material



Chem. Name: a) N-Tridecyl-2,6-dimethyl-morpholin
b) N-Tridecyl-2,6-dimethyl-tetrahydro-1,4-oxazin

Summenformel: $C_{19}H_{39}NO$

MG: 297

Kp. 139-142 (1,3 Torr)

$n_D^{25}$ 1,4568

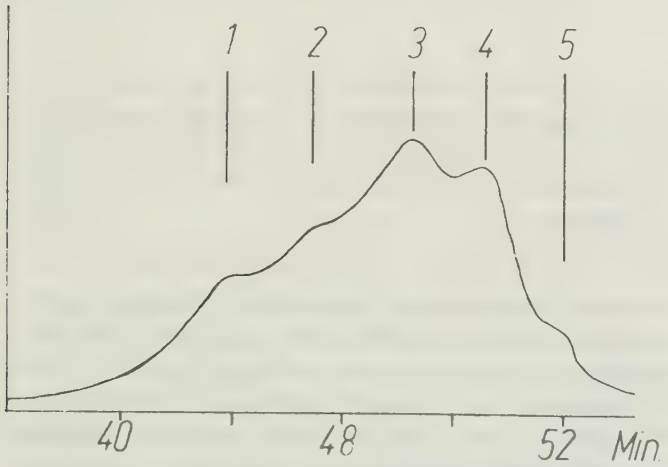
Handelsname: Calixin

Tridemorph ist eine farb- und geruchlose viskose Flüssigkeit, die mit organischen Lösungsmitteln beliebig mischbar ist.

Da für Tridemorph bereits eine colorimetrische Bestimmungsmethode der BASF vorlag (55), mußte lediglich überprüft werden, ob die Abtrennung der Substanz aus Körperflüssigkeiten analog zu Dodemorph durchgeführt werden konnte. Die quantitative Bestimmung wurde dann gaschromatographisch durchgeführt. Dazu wurden Blut, Urin und Gewebehomogenat nach Zusatz von 1 mg Tridemorph wie oben beschrieben mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde eingeengt und auf Silikagel $F_{254}$ Platten aufgetragen. Zur Reinigung wurde in Fließmittel III das Tridemorph abgetrennt. Die Tridemorphbande wurde dann mit Chloroform eluiert und gaschromatographisch untersucht. Die

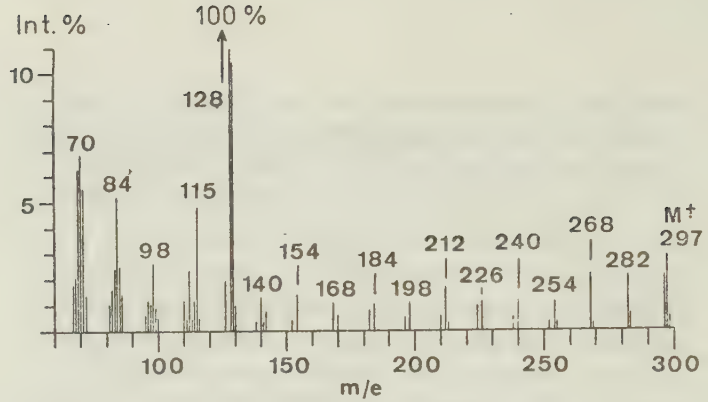
quantitative Auswertung wurde dann durch Wiegen der ausgeschnittenen Peakfläche durchgeführt. Als Vergleich dienten Chloroformverdünnungen von frisch im Vakuum destilliertem Tridemorph. Die Wiederfindung betrug bei diesem Verfahren 91 %.

Während wie bei Dodemorph in den Laufmitteln I, IV und V bei Tridemorph zwei Flecken auftraten, die beide ein identisches Massenspektrum hatten (Abb. 26 ), zeigten die Gaschromatogramme bei einer Säulentemperatur von 110° C auf Silikongummi SE 30 für Tridemorph sogar eine Auftrennung in fünf Peaks (Abb. 25 ). Diese gegenüber Dodemorph zusätzlich auftretenden Fraktionen sind dabei auf zusätzliche Isomere aus dem $C_{13}$Rest zu erklären.




Gaschromatogramm des frisch dest. Tridemorphs (130-142°C; 1,3 Torr) mit 5 Isomeren
Säule 1, Einspritzblock 70°C
Säulentemperatur 70°-1°/Min-130°C

Abb. 25




Einheitliches Massenspektrum der 5 Isomeren des Tridemorphs nach gaschromatographischer Trennung

Abb. 26

## 5. Toxikologische Untersuchungen an Bispyridiniumherbiciden

### 5.1 Untersuchungen zum Resorptionsverhalten von Bispyridiniumherbiciden

Bei den Untersuchungen zur Analytik des Diquat und des Morfamquat fielen starke Unterschiede zwischen Reinsubstanzen und Handelspräparat auf. Während die wässrigen Lösungen der drei Bispyridiniumherbicide klar und geruchlos sind, stellen die Handelspräparate von Paraquat"Gramoxone", von Diquat"Reglone"und von Morfamquat"Rasen Primus"unangenehm riechende dunkelbraune Lösungen von Substanzgemischen dar. So wurden bei Gramoxone zwei, bei Reglone zwei und bei Rasen Primus vier Begleitsubstanzen dünnschichtchromatographisch ermittelt. Im World Review of Pest Control (56) wird im Zusammenhang mit Paraquat der Einsatz von kationischen und nichtionischen Netzmitteln erwähnt. Da jedoch die bisherigen Untersuchungen zur Toxicität dieser Herbicide lediglich mit reinen wässrigen Lösungen dieser Substanzen durchgeführt wurden, mußte die Gültigkeit der Ergebnisse bei den Handelspräparaten überprüft werden.

Als erstes wurde daraufhin das Resorptionsverhalten von Reinsubstanzen und Handelpräparaten an Ratten untersucht.

| | Literatur Urin | Urin | Faeces | Summe U + F |
|---|---|---|---|---|
| Paraquat | 16-23 | 18,4 | 69,9 | 88,3 |
| Gramoxone | | 27,1 | 66,4 | 93,5 |
| Diquat | 9-11 | 11,8 | 73,2 | 85,0 |
| Reglone | | 17,0 | 72,8 | 89,8 |
| Morfamquat | 2 | 2,1 | 79,0 | 81,1 |
| Rasen Primus | | 8,5 | 74,6 | 83,1 |

Ausscheidung von Bispyridiniumverbindungen bei Ratten (Sprague Dawley ♂) innerhalb 96 Stunden (1/4 $LD_{50}$ oral).
(Angaben in %)

Tabelle 22

Aus Tabelle 22 geht hervor, daß die von mir ermittelten Werte für die in Wasser gelösten Reinsubstanzen mit den Angaben von Daniel, Gage (57) und Darter (58) gut übereinstimmen. Dagegen sind bei den Handelspräparaten aller drei Verbindungen deutlich höhere Anteile resorbiert und mit dem Harn ausgeschieden worden. Da bei diesen Untersuchungen nicht mit $^{14}C$ markierten Substanzen gearbeitet werden konnte, mußte die für Reihenuntersuchungen aufwendigere photometrische Gehaltsbestimmung benutzt werden. Um eine Metabolisierung durch Bakterien in Urin und Faeces, von der Daniel und Gage (57) berichten und deren Verlauf Bozarth (59) und Baldwin (60) klärten, dabei weitgehend

zu verhindern, wurden die im Stoffwechselkäfig herabfallenden Exkremente in einem 1 n Salzsäure enthaltenden Vorratsbehälter gesammelt. Daß diese Methode Erfolg hatte, zeigt die Summe der in vier Tagen aufgefundenen Herbicidmengen.

| | intraperitoneal | peroral |
|---|---|---|
| Paraquat | 19 | 150 |
| Diquat | 13 | 300 |
| Morfamquat | 13 | 345 |

LD 50 bei Ratten
Angaben in mg Ion/kg nach Swan

Tabelle 23

Die bei Calderbank (45) zitierten Ermittlungen von Swan über die LD 50 dieser Herbicide ließen bisher den Schluß zu, daß allein Paraquat wegen der besseren Resorption bei oraler Applikation stark toxisch ist. Diese Ansicht kann jedoch für die Handelspräparate von Diquat und Morfamquat wegen der aus meinen Untersuchungen ersichtlichen Verschiebung der Resorptionsverhältnisse nicht aufrecht erhalten werden.

Um diese Versuche abzusichern, wurde die Sterblichkeit von Versuchstieren nach Gabe von Reinsubstanz und entsprechender Menge Handelspräparat verglichen. In diesen Versuchen wurden männlichen Sprague-Dawley Ratten 1/2 der oralen LD 50 mit der Schlundsonde verabreicht. Wie aus den Tabellen 24, 25 und 26 deutlich zu erkennen ist, liegt bei allen drei Herbiciden die Sterblichkeit bei den entsprechenden Handelspräparaten bedeutend höher als bei den Reinsubstanzen. Besonders deutlich ist diese Steigerung beim

Morfamquat, bei dem die Differenz zwischen beiden Gruppen am höchsten ist. Wenn auch bei der geringen Anzahl von Versuchstieren statistische Aussagen nicht unbedingt repräsentativ sind, so konnte doch durch diese Untersuchungen bewiesen werden, daß die Erniedrigung der oralen LD 50 beim Handelspräparat des Morfamquat, dem Rasen Primus, auf die verstärkte Resorption des Wirkstoffes zurückzuführen ist.

| Todeseintritt nach | Reinsubstanz | | Handelspräparat | |
|---|---|---|---|---|
| | Tiere | % | Tiere | % |
| 3 Tagen | 1 | 8,3 | 1 | 8,3 |
| 6 Tagen | 1 | 8,3 | 3 | 25,0 |
| 9 Tagen | - | - | 1 | 8,3 |
| insgesamt | 2 | 16,6 | 5 | 41,6 |

Sterblichkeit von Sprague-Dawley Ratten ♂ (12 Tiere à 200 g) nach oraler Paraquatgabe (1/2 LD 50)

Tabelle 24

| Todeseintritt nach | Reinsubstanz | | Handelspräparat | |
|---|---|---|---|---|
| | Tiere | % | Tiere | % |
| 3 Tagen | - | - | 1 | 8,3 |
| 6 Tagen | 1 | 8,3 | 2 | 16,7 |
| 9 Tagen | - | - | 1 | 8,3 |
| insgesamt | 1 | 8,3 | 4 | 33,3 |

Sterblichkeit von Sprague-Dawley Ratten ♂ (12 Tiere à 200 g) nach oraler Diquatgabe (1/2 LD 50)

Tabelle 25

| Todeseintritt nach | Reinsubstanz | | Handelspräparat | |
|---|---|---|---|---|
| | Tiere | % | Tiere | % |
| 3 Tagen | 1 | 8,3 | 2 | 16,7 |
| 6 Tagen | - | - | 2 | 16,7 |
| 9 Tagen | - | - | 1 | 8,3 |
| insgesamt | 1 | 8,3 | 5 | 41,7 |

Sterblichkeit von Sprague-Dawley Ratten ♂ (12 Tiere à 200 g) nach oraler Morfamquatgabe (1/2 LD 50)

Tabelle 26

## 5.2 In vitro Einflüsse von Bispyridiniumherbiciden auf Mitochondrien

In seinen Untersuchungen zum Mechanismus der herbiciden Wirksamkeit des Diquat wies Mees nach (61), daß dieses im Chloroplasten die Photosynthese blockiert und das Absterben der Pflanze durch Bildung toxischer Mengen von Wasserstoffperoxid bewirkt. Die Vermutung lag nahe, daß ein ähnlicher biochemischer Prozeß der Toxizität dieser Verbindungsklasse beim Säugetier zugrunde liegen könnte. Bereits vor Verwendung von Bispyridiniumverbindungen als Herbicide waren von Packer und Vishniac (62) und Tamiya und Mitarbeitern (63) Einflüsse von Viologenen auf Dehydrogenasesysteme von Bakterien festgestellt worden.

Die bei der Pflanze im Chloroplasten lokalisierten Enzymsysteme für die oxidative Phosphorylierung haben beim Menschen ihren Sitz in den Mitochondrien. Es lag daher nahe, daß ich den Einfluß dieser chloroplastenwirksamen Herbicide auf Mitochondrien verschiedener Organe eingehender untersuchte. Die Annahme von Gage, Mitochondrienmembranen seien auf Grund seiner Untersuchungen (64) für quartäre Bispyridiniumverbindungen unpassierbar, muß bei seiner Versuchsanordnung als nicht ausreichend bewiesen angesehen werden. Es muß für unwahrscheinlich gehalten werden, daß so ähnlich gebaute Membransysteme wie Chloroplasten- und Mitochondrienmembran ein völlig unterschiedliches Penetrationsverhalten gegenüber dieser Herbicidklasse zeigen. Vergleicht man die Untersuchungen von Mees (61) an Pflanzen mit denen von Gage (64) an Rattenlebermitochondrien, so fallen sofort die unterschiedlichen Versuchszeiten auf. Während sich die Messungen von Mees bis zu vierzig Stunden ausdehnen, laufen die Untersuchungen von Gage nur über wenige Minuten. Die Schwierigkeiten, diese Untersuchungen über einen längeren Zeitraum auszudehnen, liegen in der kurzen Lebensdauer intakter Mitochondrien begründet.

Zunächst untersuchte ich den Einfluß von Paraquat, Diquat und Morfamquat in verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit (Tab. 27 - 35). Darauf wurde ein Vergleich mit den Handelspräparaten durchgeführt (Tab. 36 - 38). Zur Kontrolle der mitochondroidalen Atmung und der oxidativen Phosphorylierung wurde die von Chance und Williams (65) vorgeschlagene Methode verwendet. Dabei wird die Abnahme des Sauerstoffgehalts der Mitochondrienpufferlösung über eine Sauerstoffelektrode gemessen. Lardy und Wellman berichteten über die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von anwesendem anorganischen Phosphat und ADP. Der verbrauchte Sauerstoff ist dabei dem gebildeten ATP direkt proportional (67).

| Paraquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 26,4 | 230 | 1,96 | 8,1 |
| 0,05 | 26,5 | 228 | 1,97 | 8,0 |
| 0,5 | 26,3 | 230 | 1,96 | 8,2 |
| 5,0 | 29,3 | 234 | 1,92 | 7,4 |
| 5,0 + | 0,4 | - | - | - |

Temperatur: 23°C Protein: 9,1 mg/3 ml
Succ.: 3,3 mM ADP: 900 nMol
+ Antimycin A: 0,2 µg
Atmungsmessung unmittelbar nach Paraquatzusatz

Tabelle 27

| Paraquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 26,5 | 231 | 1,95 | 8,1 |
| 0,05 | 26,6 | 232 | 1,94 | 7,9 |
| 0,5 | 29,7 | 235 | 1,92 | 7,3 |
| 5,0 | 33,1 | 238 | 1,89 | 6,7 |
| 5,0 + | 0,3 | - | - | - |

Bedingungen wie Tabelle 27
Atmungsmessung 10 Min. nach Paraquatzusatz

Tabelle 28

| Paraquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 26,5 | 231 | 1,95 | 8,1 |
| 0,05 | 27,4 | 232 | 1,94 | 7,85 |
| 0,5 | 35,2 | 235 | 1,92 | 6,36 |
| 5,0 | 40,1 | 238 | 1,89 | 5,69 |
| 5,0 + | 0,5 | - | - | - |

Bedingungen wie Tabelle 27
Atmungsmessung 1 Stunde nach Paraquatzusatz

Tabelle 29

| Diquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 25,2 | 227 | 1,98 | 8,0 |
| 0,05 | 25,1 | 227 | 1,98 | 8,0 |
| 0,5 | 25,2 | 228 | 1,97 | 8,0 |
| 5,0 | 28,1 | 229 | 1,97 | 7,3 |
| 5,0 | 0,3 | - | - | - |

Temperatur: 24°C Protein: 8,7 mg/3 ml
Succ.: 3,3 mM ADP: 900 nMol
+ Antimycin A: 0,2 ug
Atmungsmessung unmittelbar nach Diquatzusatz

Tabelle 30

| Diquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 25,3 | 228 | 1,97 | 8,0 |
| 0,05 | 26,4 | 229 | 1,97 | 7,8 |
| 0,5 | 28,9 | 230 | 1,96 | 7,1 |
| 5,0 | 33,6 | 232 | 1,94 | 6,26 |
| 5,0 + | 0,4 | - | - | - |

Bedingungen wie Tabelle 30
Atmungsmessung 10 Min. nach Diquatzusatz

Tabelle 31

| Diquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 25,3 | 228 | 1,97 | 8,0 |
| 0,05 | 28,4 | 230 | 1,96 | 6,6 |
| 0,5 | 37,7 | 235 | 1,92 | 5,7 |
| 5,0 | 43,1 | 237 | 1,90 | 5,1 |
| 5,0 | 0,4 | - | - | - |

Bedingungen wie Tabelle 30
Atmungsmessung 1 Stunde nach Diquatzusatz

Tabelle 32

| Morfamquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 26,9 | 230 | 1,96 | 7,9 |
| 0,05 | 26,8 | 230 | 1,96 | 7,9 |
| 0,5 | 27,1 | 230 | 1,96 | 7,9 |
| 5,0 | 28,6 | 231 | 1,95 | 7,5 |
| 5,0 | 0,5 | -- | - | - |

Temperatur: 22°C  Protein: 9,3 mg/3 ml
Succ.: 3,3 mM  ADP: 900 nMol
+ Antimycin A: 0,2 µg
Atmungsmessung unmittelbar nach Morfamquatzusatz

Tabelle 33

| Morfamquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 26,9 | 230 | 1,96 | 7,9 |
| 0,05 | 28,2 | 231 | 1,95 | 7,6 |
| 0,5 | 30,8 | 232 | 1,94 | 7,0 |
| 5,0 | 36,1 | 234 | 1,92 | 6,1 |
| 5,0 + | 0,5 | - | - | - |

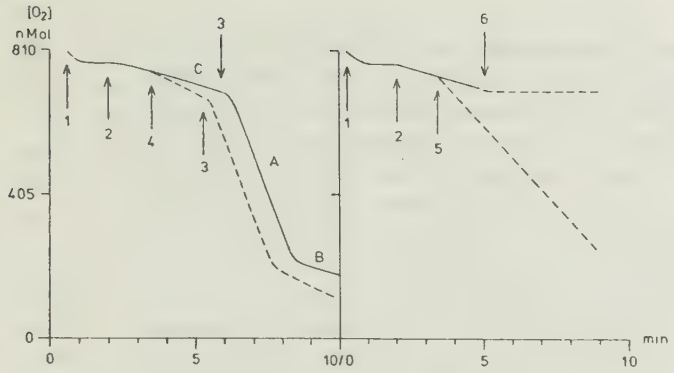
Bedingungen wie Tabelle 33
Atmungsmessung 10 Min. nach Morfamquatzusatz

Tabelle 34

| Morfamquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 27,0 | 230 | 1,96 | 7,9 |
| 0,05 | 29,7 | 232 | 1,94 | 7,3 |
| 0,5 | 40,0 | 336 | 1,91 | 5,6 |
| 5,0 | 46,3 | 240 | 1,87 | 5,0 |
| 5,0 + | 0,6 | - | - | - |

Bedingungen wie Tabelle 33
Atmungsmessung 1 Stunde nach Morfamquatzusatz

Tabelle 35




1 Zusatz von: 100 µl Mitochondrien Suspension
2 Zusatz von: Succinat (Endkonzentration 3,3 mM)
3 Zusatz von: ADP 1800 n Mol
4 Zusatz von: Paraquat (Endkonzentration 5 mM)
5 Zusatz von: Gramoxone = Paraquat (Endkonzentration 0,1 mM)
6 Zusatz von: Gramoxone = Paraquat (Endkonzentration 1,0 mM)

RCR (Respiratory control vatio) = Steigung A : Steigung B

$O_2$-Verbrauch bei der ox. Phosphorylierung:
Differenz zwischen den Schnittpunkten von CA und BA
Temperatur: 23°C

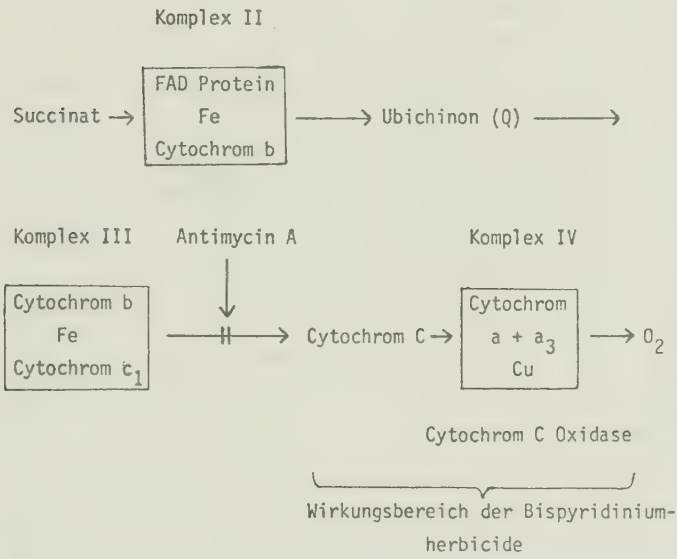
Abb. 27

Abbildung 27 zeigt ein solches Sauerstoffdiagramm am Beispiel intakter Mitochondrien und nach Zusatz von Paraquat und Gramoxone. Die Auswertungen dieser Ergebnisse zeigen, daß bei einer Messung unmittelbar nach Zusatz der Herbicide im Bereich einer Gesamtkonzentration von 0,05 mM und 0,5 mM kein Einfluß auf die Mitochondrien feststellbar war (Tab. 27, 30,33). Erst bei einer Konzentration von 5,0 mM ist ein geringer Anstieg der Succinatatmung zu beobachten. Läßt man die Herbicide jedoch zehn Minuten in der Pufferlösung auf die Mitochondrien einwirken, so zeigt sich nach Zugabe von Succinat bereits bei einer Konzentration von 0,5 mM ein Einfluß auf die Succinatatmung (Tab. 28, 31, 34). Daß diese Steigerung des Sauerstoffverbrauchs nicht auf einen Alterungsproßez der Mitochondrien zurückzuführen ist, zeigen die Kontrollwerte.

Um die Einwirkungszeit der drei Herbicide noch zu verlängern, wurde folgender Weg eingeschlagen: Die Mitochondriensuspension wurde mit einer isotonischen Herbicid-Saccharoselösung auf eine Bispyridiniumkonzentration von 0,05, 0,5 und 5,0 mM gebracht und im Eisbad eine Stunde aufbewahrt. Der Vergleichswert wurde mit reiner Saccharoselösung entsprechend versetzt. Zur Atmungskontrolle wurde nach einer Stunde mit Puffer pH 7,4, der die entsprechende Herbicidkonzentration besaß, auf 3 ml aufgefüllt. Dabei zeigte sich bei allen drei Verbindungen eine deutliche Steigerung der Succinatatmung (Tab. 29, 32, 35), die bereits bei einer Herbicidkonzentration von 0,05 mM eingesetzt. Im Bereich von 5,0 mM beträgt die Zunahme für Paraquat 51,4 %, für Diquat 70,4 % und für Morfamquat 71,5 %. Der P/O Quotient blieb dabei fast konstant. Die Werte der Vergleichsmitochondrien zeigen, daß auch in diesem Fall die Wirkung auf die Herbicidzusätze zurückzuführen ist und nicht auf eine durch die Wartezeit hervorgerufene Schädigung.

Diese Versuche beweisen, daß die drei genannten Verbindungen durch die Außenmembran zu dem auf der Innenmembran lokalisierten Succinatdehydrogenasesystem und dem nachgeschalteten Elektronentransportsystem vordringen können. Dieser Vorgang ist sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, wie z.B. beim 2,4 Dinitrophenol, findet dabei jedoch nicht statt.

Um Aufschlüsse über den Angriffsort der drei Herbicide in diesen Systemen zu erhalten, wurde als Hemmstoff der Atmungskette Antimycin A eingesetzt. Wie aus allen Versuchen hervorgeht, wurde durch diesen Zusatz die Succinatatmung auch bei einer Herbicidkonzentration von 5,0 mM praktisch vollständig blockiert. Der Eingriff dieser Verbindungen liegt bei der von mir verwendeten Versuchsanordnung demnach im Bereich Cytochrom C:Cytochrom C Oxidase.



Dabei wirken die Bispyridiniumverbindungen als Elektronenacceptor; die dabei entstehenden Monoradikale werden bei Anwesenheit von Sauerstoff sofort wieder zur Ausgangsverbindung oxidiert. Das Gleichgewicht liegt dabei fast vollständig auf der Seite der oxidierten Form, so daß die intensive Färbung der zum Monoradikal reduzierten Verbindung nicht auftritt. Dieses Ergebnis wird durch die weiter unten beschriebenen Untersuchungen an Mikrosomen bestätigt.

Wie aus dem Vergleich der Reinsubstanzen mit den Handelspräparaten hervorgeht, zeigen diese unmittelbar nach Herbicidzusatz bereits bei geringen Konzentrationen (0,01 mM) einen Einfluß auf die Succinatatmung. Dies dürfte auf die Permeabilitätsveränderungen der Membran durch den Zusatz

| Gramoxone ≙ Paraquat mM | Succ. Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 26,2 | 230 | 1,96 | 7,8 |
| 0,01 | 34,9 | 239 | 1,88 | 6,1 |
| 0,1 | 93,6 | - | - | - |
| 1,0 | - | - | - | - |

Temperatur: 23°C 9,0 mg Protein/3 ml ADP 900 nMol
Succ.: 3,3 mM

Tabelle 36

| Reglone ≙ Diquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 27,4 | 231 | 1,95 | 7,7 |
| 0,01 | 48,3 | 243 | 1,85 | 4,8 |
| 0,1 | 103,5 | - | - | - |
| 1,0 | - | - | - | - |

Temperatur: 24°C 9,6 mg Protein/3 ml ADP 900 nMol
Succ.: 3,3 mM

Tabelle 37

| Rasen Primus ≙ Morfamquat mM | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| - | 27,1 | 228 | 1,97 | 7,9 |
| 0,01 | 49,4 | 240 | 1,87 | 4,7 |
| 0,1 | 134,4 | - | - | - |
| 1,0 | - | - | - | - |

Temperatur: 23°C 9,2 Protein/3 ml ADP 900 nMol
Succ.: 3,3 mM

Tabelle 38

von Netzmitteln zurückzuführen sein. Im Bereich von 1,0 mM erfolgt dann eine völlige Einstellung der Enzymaktivität (Tab. 36-38). Dabei kann nicht entschieden werden, ob dieser Effekt durch die Bispyridiniumverbindungen oder durch die Hilfsstoffe hervorgerufen wird.

## 5.3 In vivo Einflüsse von Bispyridiniumherbiciden auf Mitochondrien

Zur Ergänzung dieser in vitro Untersuchungen sollte die Phosphorylierungsleistung von Mitochondrien nach Gabe der Herbicide am lebenden Tier untersucht werden. Nach Verabfolgung der oralen $LD_{50}$ wurden die Ratten nach drei Tagen getötet und die Mitochondrien von Leber und Lunge präpariert. Dabei zeigte sich ein den in vitro Untersuchungen vergleichbarer Effekt (Tab. 39-41). Auch die Lungenmitochondrien brach-

| | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. $O_2$ nMol | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| Vergleich | 25,2 | 229 | 1,97 | 8,0 |
| + 1.0 mM Paraquat | 25,7 | 229 | 1,97 | 7,9 |
| Paraquat Mitochondr. | 42,3 | 238 | 1,89 | 5,2 |
| + 1.0 mM Paraquat | 48,5 | 242 | 1,86 | 4,6 |

Vergleich: 8,6 mg Protein/3 ml
Paraquat Mitochondrien: 8,9 mg Protein/3 ml
Temperatur: 22°C Succ.: 3,3 mM ADP 900 nMol
Rattenlebermitochondrien von S.D. ♂ (200 g) 3 Tage nach Paraquatgabe ($LD_{50}$ oral)

Tabelle 39

| | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. $O_2$ nMol | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| Vergleich | 25,0 | 227 | 1,98 | 8,3 |
| + 1.0 mM Diquat | 25,6 | 228 | 1,97 | 8,1 |
| Diquat Mitochondr. | 53,7 | 243 | 1,85 | 4,4 |
| + 1.0 mM Diquat | 60,1 | 246 | 1,83 | 4,0 |

Vergleich 8,5 mg Protein/3 ml
Diquat Mitochondrien: 9,0 mg Protein/3 ml
Temperatur: 24°C Succ.: 3,3 mM ADP 900 nMol
Rattenlebermitochondrien von S.D. ♂ (200 g) 3 Tage nach Diquatgabe ($LD_{50}$ oral)

Tabelle 40

| | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. $O_2$ nMol. | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| Vergleich | 26,2 | 228 | 1,97 | 8,2 |
| + 1.0 mM Morfamquat | 26,5 | 228 | 1,97 | 8,1 |
| Morfamquat Mitochondr. | 51,8 | 241 | 1,86 | 4,7 |
| + 1.0 mM Morfamquat | 57,8 | 243 | 1,85 | 4,3 |

Vergleich: 9,1 mg Protein/3 ml
Morfamquat Mitochondrien 8,8 mg Protein/3 ml
Temperatur: 23°C Succ.: 3,3 mM ADP 900 nMol
Rattenlebermitochondrien von S.D. ♂ (200 g) 3 Tage nach Morfamquatgabe ($LD_{50}$ oral).

Tabelle 41

ten entsprechende Ergebnisse (Tab. 42). Zusätzlich fällt aber auf, daß eine Membranschädigung eingetreten sein muß. Bei weiterem Herbicidzusatz war jetzt unmittelbar danach ein Anstieg der Succinatatmung zu beobachten. Außerdem sind die Membranen im Gegensatz zu intakten Mitochondrien für zugesetztes $NADH_2$ durchlässig, was sich in einem weiteren Anstieg des Sauerstoffverbrauchs ausdrückt.

Der Eingriff in die Atmungskette ist also nur ein Effekt dieser Substanzklasse. Er kann für den Verlauf der Intoxikation nicht verantwortlich sein. Wichtiger scheint der Einfluß dieser Verbindungen auf die mikrosomale Fraktion zu sein. Dabei ist ein Einfluß auf Reaktionen, die askorbinsäureabhängig sind, festzustellen. Bereits Orr (68) wies nach, daß Paraquat und Diquat

| Mitochondrien | Succ.Atmung nMol $O_2$/Min. | Ox.Phos. nMol $O_2$ | P/O | RCR |
|---|---|---|---|---|
| Vergleich | 10,6 | 239 | 1,88 | 7,2 |
| Paraquat | 24,3 | 267 | 1,69 | 3,7 |
| Diquat | 27,4 | 269 | 1,67 | 3,4 |
| Morfamquat | 25,8 | 268 | 1,68 | 3,5 |

Protein/3 ml: Vergleich 3,6 mg; Paraquat 3,9 mg; Diquat 3,5 mg; Morfamquat 3,7 mg.
Temperatur: 23°C
Lungenmitochondrien der Versuchsgruppen aus Tab. 39-41
ADP 900 nMol Succ. 3,3 mM

Tabelle 42

die Kollagensynthese und die Hyaluronsäurereaktionen beeinflussen. Ein ähnlicher Vorgang könnte auch der Membranschädigung zugrunde liegen. Die Vermutung, daß für die von mir beobachteten verstärkten Effekte bei den Handelspräparaten Verunreinigungen mit 2,2', bzw. 4,4'Bispyridin als Reste aus der Synthese verantwortlich sein könnten, ließ sich nicht aufrecht erhalten, da ich dünnschichtchromatographisch diese Verbindungen ausschließen konnte. Der Verdacht auf diese beiden Verbindungen lag nahe, da ihre biochemischen Wirkungen (69, 70), den von Orr bei Paraquat und Diquat beobachteten entsprechen.

## 5.4 Einflüsse der Bispyridiniumherbicide auf die mikrosomale Fraktion

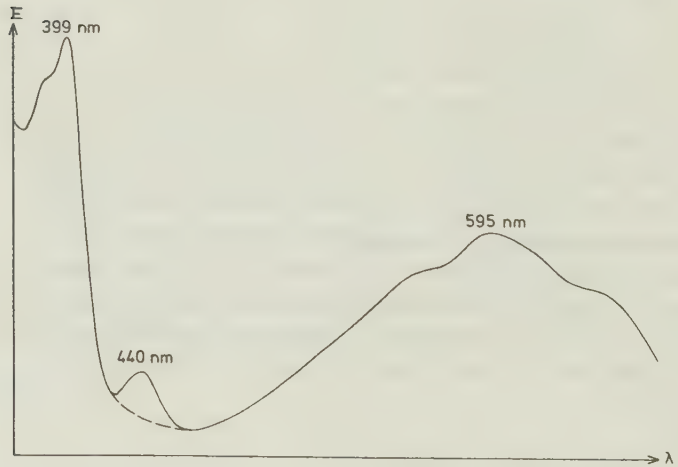
Den Nachweis über den Einfluß der drei Herbicide auf die Askorbinsäureoxidation der mikrosomalen Fraktion konnte ich durch Zusatz von Natriumaskorbat im Überschuß zu einer Mikrosomen enthaltenden Pufferlösung erbringen. Messungen des Sauerstoffverbrauchs ergaben dabei eine Steigerung um etwa 100 %. Nach Verbrauch des Sauerstoffs der Pufferlösung trat dann die Farbe der Monoradikale der jeweiligen Herbicide auf.

Da auch die Vergiftungserscheinungen bei Ratten, wie z.B. Blutungen und starke Gewichtsabnahme trotz Ernährung mit der Schlundsonde in das Bild des Askorbinsäuremangels paßten, wurde die Abhängigkeit der oralen $LD_{50}$ bei Ratten von einer Askorbinsäuregabe untersucht (Tab. 43). Dabei konnte jedoch keine Vergrößerung der Überlebensrate gegenüber Vergleichstieren gefunden werden. Die mit Ascorbinsäure behandelten Tiere lebten jedoch im Durchschnitt 48 Stunden länger. Es muß daher angenommen werden, daß bei der Oxidation der Bispyridiniumradikale entstehende Produkte hauptsächlich für die Toxizität dieser Verbindungen verantwortlich sind.

| | Paraquat | Diquat | Morfamquat | |
|---|---|---|---|---|
| Vergleich | 10 | 9 | 9 | Anzahl d. Tiere |
| | 83,3 | 75,0 | 75,0 | % |
| Enzym-induktion Pheno-Barbital-Na | 2 | 2 | 1 | Anzahl d. Tiere |
| | 16,7 | 16,7 | 8,3 | % |
| 100 mg Na-ascorbat /die | 9 | 9 | 8 | Anzahl d. Tiere |
| | 75,0 | 75,0 | 66,7 | % |

Sterblichkeit von S.D. ♂ Ratten (200 g) nach Gabe der $LD_{50}$ oral bei je 12 Tieren innerhalb von 10 Tagen.

Tabelle 43




Reduktion des Morfamquat durch $NADPH_2$ in der mikrosomalen Fraktion bei pH 7,5

---- Absorption bei Reduktion mit $Na_2S_2O_4$

Abb. 28

Ebenso, wie die mikrosomale Oxidation von Askorbinsäure durch die Bispyridiniumherbicide beschleunigt wird, wird auch $NADPH_2$ bei Zusatz dieser Verbindungen verstärkt oxidiert. Nimmt man das Spektrum des nach völligem Sauerstoffverbrauch der Lösung auftretenden Radikals einer dieser drei Verbindungen auf (Abb. 28), so zeigt sich gegenüber der mit Natriumdithionit reduzierten Substanz eine zusätzliche Bande bei 440 nm. Daraus kann geschlossen werden, daß diese Reaktion im Zusammenhang mit dem Cytochrom P 450 System steht (71, 72). Das Gleichgewicht, daß sich aus der zugesetzten Menge Herbicid, deren maximaler Extinktion bei Natriumdithionitreduktion und der gemessenen Extinktion leicht errechnen läßt, liegt dabei auch unter anaeroben Bedingungen zu 95 % auf der Seite der oxidierten Verbindungen.

Wie Tabelle 43 zeigt, läßt eine Enzyminduktion der mikrosomalen Fraktion durch Phenobarbital-Natrium vor Gabe der oralen $LD_{50}$ die Überlebensrate wesentlich steigen. Die für die Toxizität verantwortlichen, im Körper verbleibenden, geringen Herbicidmengen werden demnach nicht langsam unverändert ausgeschieden, sondern auch im mikrosomalen Bereich metabolisiert. Läuft dieser Prozeß bedingt durch die Enzyminduktion beschleunigt ab, so kann die Toxizität dieser Verbindungsklasse bedeutend erniedrigt werden.

## III. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden photometrische Methoden zur quantitativen Bestimmung der Herbicide Äthylen-dipyridinium-dibromid, Diquat, und 1,1'-Di-(3,5-dimethylmorpholinocarbamoylmethyl) 4,4'-dipyridylium-dichlorid, Morfamquat, untersucht. Dabei wurden die optimalen Bedingungen der für beide Verbindungen spezifischen Reduktion zum intensiv gefärbten Monoradikal erarbeitet und zur Grundlage der Gehaltsbestimmung gemacht.

Zur Abtrennung beider Substanzen aus biologischem Material wurden verschiedene Verfahren in Hinsicht auf Anreicherung von Spuren, Ausbeute und Arbeitsaufwand untersucht. Die besten Ergebnisse konnten mit stark sauren Kationenaustauschern erzielt werden. Für dieses Verfahren wurden Parameter festgelegt, bei deren Einhaltung eine schnelle und doch quantitative Isolierung möglich ist. In Verbindung mit der photometrischen Gehaltsbestimmung stehen dadurch im Falle der Intoxikation mit einem dieser Herbicide Methoden zur schnellen quantitativen Bestimmung auch geringster Konzentrationen zur Verfügung.

Für die Fungicide N-Cyclododecyl-2,6-dimethyl-morpholin, Dodemorph, und N-Tridecyl-2,6-dimethylmorpholin, Tridemorph, wurden die Bedingungen für die quantitative Abtrennung aus biologischem Material und für die Bestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie festgelegt. Für Dodemorph wurde zusätzlich über den Weg des Pikrats eine photometrische Bestimmungsmethode erarbeitet.

Die toxikologischen Untersuchungen wurden am 1,1'-Dimethyl-4,4'-dipyridylium-dichlorid, Paraquat, und an den bereits genannten

Bispyridiniumverbindungen durchgeführt. Dabei konnte ein starker Anstieg der Resorption und damit der Toxizität der Handelspräparate gegenüber den Reinsubstanzen nachgewiesen werden, der auf Netzmittelzusätze zurückzuführen ist. Die Untersuchungen an Rattenlebermitochondrien unter verschiedensten Bedingungen zeigten, daß alle drei Verbindungen in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration in der Lage sind, die Mitochondrienmembran zu durchdringen. Dabei verstärken sie die Succinatatmung erheblich. Da der P/O Quotient fast unverändert bleibt, ist auszuschließen, daß diese Herbicide eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung hervorrufen. Durch Hemmstoffzusatz konnte das Cytochrom c:Cytochrom c Oxidasesystem als Eingriffspunkt dieser Verbindungen ermittelt werden.

In der mikrosomalen Fraktion beschleunigen die Bispyridiniumherbicide die Oxidation von Ascorbinsäure und $NADPH_2$. Mit Hilfe der Spektralphotometrie konnte gezeigt werden, daß $NADPH_2$ dabei über das Cytochrom P 450 System oxidiert wird. Für die Toxizität dieser Verbindungen, die durch verstärkte Metabolisierung infolge einer Enzyminduktion mit Phenobarbital bei Versuchstieren stark herabgesetzt werden konnte, müssen demnach hauptsächlich zwei Faktoren verantwortlich sein: Der eine ist der durch die fortgesetzte unkontrollierte Oxidation biochemischer Energieträger bedingte Mangelzustand, welcher das Ausbleiben wichtiger Syntheseleistungen zur Folge hat. Der andere Faktor ist die Bildung toxischer Produkte bei der Oxidation der intermediär entstehenden Herbicidmonoradikale.

## IV. Experimenteller Teil

### 1. Allgemeine Angaben

#### Schmelzpunkte

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden mit einem Lindström Block ermittelt. Es handelt sich um unkorrigierte Werte.

#### Spektren im UV- und sichtbaren Bereich

Die Spektren im UV- und sichtbaren Bereich wurden an folgenden Geräten aufgenommen: Übersichtsspektren wurden mit dem selbstregistrierenden Beckman DB-G Spektralphotometer aufgenommen. Für die Messungen trüber Lösungen, z.B. Mikrosomensuspensionen, wurde ein Aminco DW-2 UV-Visible Spektralphotometer verwendet. Maxima und Eichgeraden wurden mit einem Zeiss PM 4 Q II Photometer ermittelt.

#### MS Spektren

Die Aufnahme erfolgte im Varian Massenspektrometer CH 7.

#### Gaschromatographie

Die Untersuchungen erfolgten mit einem Hewlett-Packard Gaschromatographen Scientific 5750 mit Flammenionisationsdetektor. Als Trägergas diente Stickstoff (40 ml/Min.).

Es wurden gepackte Säulen der Firma Hewlett-Packard verwendet (Länge 5 ft. Ø 1/8 Zoll).

Säule 1: 5 % KOH und 10 % Silikongummi SE 30 auf Chromosorb GAWDMCS 80-100 mesh

Säule 2: 1 % KOH und 10 % Silikongummi SE 30 auf Chromosorb GAWDMCS 80-100 mesh

Kombinierte Gaschromatographie mit Massenspektrometrie

Die Untersuchungen wurden mit einem Varian MAT 111 und den oben angegebenen Säulen durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden Kieselgel $GF_{254}$ Fertigplatten Merck verwendet. Dabei wurde mit folgenden Fließmitteln gearbeitet (Angaben in Volumenteilen):

| Fließmittel | | | |
|---|---|---|---|
| | I | Butan (1)ol /0,5 n HCl/$H_2O$ | 4 : 1 : 2 |
| | II | 5 M $NH_4Cl$ | |
| | III | Benzol/Äthanol | 7 : 3 |
| | IV | Aceton/$H_2O$ | 85 : 15 |
| | V | Methanol/$CHCl_3$/conc. $NH_3$ | 20 : 80 : 1 |

Die Detektion erfolgte mit Dragendorff's-Reagens (73) oder durch UV-Löschung.

2. Paraquat, Diquat, Morfamquat

Die drei Bispyridiniumherbicide wurden von der Plant Protection Ltd. Research Department (Yalding) zur Verfügung gestellt. Vor ihrer Verwendung wurden Paraquat und Diquat aus einem Wasser/Aceton-Gemisch umkristallisiert, Morfamquat aus einem Methanol/Aceton-Gemisch (74).

Die Handelspräparate Gramoxone, Reglone und Rasen Primus wurden von der Fa. E. Merck AG, Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

3. Dodemorph, Tridemorph

Beide Substanzen und auch die Handelsprodukte wurden von der BASF Ludwigshafen a. Rh. zur Verfügung gestellt. Dodemorph wurde vor Verwendung aus $H_2O$/Äthanol umkristallisiert. Tridemorph wurde bei 1,3 Torr am Kugelrohr frisch destilliert (130 - 142° C).

4. Dodemorphmethojodid

0,5 g Dodemorph wurden mit 1 g Methyljodid jeweils in 2 ml Nitromethan gelöst (75). Die vereinigten Lösungen wurden nach 1 Stunde am Rückfluß 10 Min. erhitzt und über Nacht stehen gelassen. Die abgeschiedenen Kristalle wurden zweimal aus Methylenchlorid/Äther umkristallisiert.
Ausbeute: 82,5 % Fp. 209-211°C

5. Dodemorphpikrat

0,5 g Dodemorph wurde in Äthanol gelöst und mit einer gesättigten ätholischen Pikrinsäurelösung versetzt (76). Dann wurde 20 Min. am Rückfluß bis zum Sieden erhitzt, langsam abgekühlt und über Nacht stehen gelassen. Die ausgefallenen Kristalle wurden aus Äthanol zweimal umkristallisiert.
Ausbeute: 89,7 % Fp. 162-164°C

6. Paraquatbestimmung

Die Aufarbeitung des biologischen Materials und die quant. Bestimmung erfolgte nach der von Beyer (31) angegebenen Methode.

7. Diquatbestimmung

Die Aufarbeitung und Auswertung des biologischen Materials wurde nach den im Experimentellen Teil dargelegten Prinzipien folgendermaßen durchgeführt:

Herstellung der Austauschersäule. Zuerst wird etwa 2 cm hoch Glaswolle in das Austauscherrohr gefüllt. Darauf werden 3,5 g Kationenaustauscher eingeschlämmt. Zur Reinigung und Aktivierung des Austauschers werden nacheinander zweimal 25 ml heißes Methanol, 10 ml Wasser und 50 ml gesättigte Natriumchloridlösung innerhalb 1 Stunde aufgegeben. Danach wird mit 25 ml Wasser gespült. Die Säule ist nunmehr zum einmaligen Gebrauch fertig.

Auftragen der Probe und Elution. Die zu untersuchende Probe wird mit Wasser auf 400 ml aufgefüllt und in einen 500 ml Scheidetrichter gegeben. Bei Urin, Blut und anderen Flüssigkeiten beträgt die Ausgangsmenge - je nach zu erwartender Diquatkonzentration - 10 bis 200 ml. Aufbereitung von Stuhl siehe Anmerkung. Das Gesamtvolumen von 400 ml wird in 40 Min. auf die Säule gegeben. Anschließend wird mit 200 ml Wasser von 60°C gespült. Nun erfolgt die Elution mit 50 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung. Die Geschwindigkeit soll 0,5 ml pro Min. betragen.

Messung und Auswertung. 2,5 ml des ungeschüttelten Eluats werden in eine 1 cm Küvette pipettiert. Dazu kommen 0,5 ml einer 1 % Natriumdithionitlösung in 0,5 n Natronlauge. Diese ist vor Gebrauch frisch herzustellen. Die Küvette wird verschlossen und umgeschwenkt. Innerhalb von 3 Min. wird die Extinktion bei 379 nm gemessen. Als Vergleich dient eine Mischung aus 2,5 ml ges. Ammoniumchloridlösung und 0,5 ml Reagenzlösung. Reine Ammoniumchloridlösung genügt nicht, da Natriumdithionit bei

379 nm bereits eine Eigenextinktion besitzt. Das Lambert-Beersche Gesetz ist im Bereich von 0 bis 20 µg/ml erfüllt. Bei höherer Konzentration ist mit Elutionsmittel zu verdünnen. Steht kein Diquat zur Aufstellung einer Eichgeraden zur Verfügung, ist die Konzentration dem beigefügten Diagramm zu entnehmen.

Bei der Auswertung der aus der Eichgeraden in µg Diquat/ml entnommenen Werte gelten für die Ausgangskonzentration folgende Umrechnungsfaktoren: 10 ml Untersuchungsflüssigkeit: F = 5, 50 ml: F = 1, 100 ml: F = 0,5, 200 ml: F = 0,25. Eine Verdünnung bei zu hoher Konzentration ist extra zu berücksichtigen! (Abb. 8)

Endergebnis: µl/ml Probe.

Anmerkungen. Von der Austauschersäule lassen sich nach dem angegebenen Verfahren Diquatmengen von 10 bis 2000 µg mit 95 % Ausbeute eluieren. Die Konzentration im Eluat liegt dann zwischen 0,2 und 40 µg/ml. Dabei spielt die Probemenge, aus der das Diquat abgetrennt wurde, keine Rolle. Im Bedarfsfall können auch größere Flüssigkeitsmengen über den Austauscher gegeben werden, um darauf das Diquat anzureichern.

Stuhl: 50 ml Stuhl mit Wasser aufschlämmen, filtrieren oder zentrifugieren, den Rückstand mit 200 ml Wasser waschen und erneut zentrifugieren. Die vereinigten Flüssigkeiten auf 400 ml auffüllen und über die Säule geben.

Lebensmittel: 50 g Lebensmittel werden zerkleinert und zu einem wäßrigen Brei homogenisiert. Dieser wird zentrifugiert. Der Rückstand wird viermal mit 100 ml Wasser gewaschen und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden über die Säule gegeben.

8. Morfamquatbestimmung

Die Aufarbeitung und Auswertung des biologischen Materials wurde nach den im Experimentellen Teil dargelegten Prinzipien folgendermaßen durchgeführt:

Herstellung der Austauschersäule. Auf einen Schliffhahn wird ein Liebigkühler gesetzt; die Wasseranschlüsse werden mit der Umwälzanlage eines Thermostaten verbunden. Um Zeitverluste beim Aufheizen zu vermeiden, unterbricht man den Heizwasserumlauf mit einer Schlauchklemme und kann so den Thermostaten bereits bei Aufgabe der Untersuchungslösung getrennt erwärmen. Dann Glaswolle (2 cm) einfüllen. Nun 3.5 g Kationenaustauscher Permutit RS 40 mit Wasser einschlämmen. Zur Reinigung und Aktivierung des Austauschers werden nacheinander zweimal 25 ml heißes Methanol, 10 ml Wasser und zweimal gesättigte Natriumchloridlösung innerhalb 1 Stunde aufgegeben. Danach wird bei gleicher Durchlaufgeschwindigkeit mit 25 ml Wasser gespült. Die Säule ist nunmehr zum einmaligen Gebrauch fertig.

Auftragen der Probe und Elution. Die zu untersuchende Probe wird mit Wasser auf 400 ml aufgefüllt und in einem 500 ml Scheidetrichter gegeben. Bei Urin und anderen Flüssigkeiten beträgt die Ausgangsmenge - je nach zu erwartender Morfamquatkonzentration - 50 bzw. 200 ml. Blut und Stuhl siehe Anmerkung. Das Gesamtvolumen von 400 ml wird in einem Zeitraum von 40 Min. auf die Säule gegeben. Anschließend wird innerhalb von 30 Min. mit 200 ml Wasser nachgespült. Durch Öffnen der Schlauchklemme wird der Ionenaustauscher durch den bereits heißen Thermostaten auf $96^{0}$ gebracht. Die Elution erfolgt mit 50 ml bei Raumtemperatur gesättigter Ammoniumchloridlösung, die vorher am Rückfluß auf $96^{0}$ erwärmt wurde. Zur Einstellung des pH zwischen 7.4 und 7.8 wird der Ammoniumchloridlösung 1 % Natriumhydrogencarbonat 3 Min. vor Beginn der Elution zugesetzt. Die Elutionsgeschwindigkeit soll 0.5 ml/Min. betragen.

Messung und Auswertung. In ein Reagenzglas mit Schliff werden 20 mg Natriumdithionit und 10 ml des umgeschüttelten Eluats gegeben. Das verschlossene Reagenzglas wird zweimal vorsichtig umgeschwenkt. Innerhalb von 3 Min. wird die Extinktion bei 399 nm gemessen. Das Lambert-Beersche Gesetz ist im Bereich von 0-10 µg/ml erfüllt. Ab 10 µg Morfamquat ist dann mit Elutionsmittel 1 + 1 zu verdünnen. Als Vergleich dient eine Lösung von 20 mg Natriumdithionit in 10 ml Elutionsmittel.

Bei der Auswertung der aus der Eichgeraden in µg Morfamquat/ml (Abb. 21) entnommenen Werte gelten folgende Umrechnungsfaktoren: 10 ml Untersuchungsflüssigkeit F = 5, 50 ml F = 1, 200 ml F = 0,25. Eine Verdünnung bei zu hoher Konzentration ist extra zu berücksichtigen! Endergebnis: µg/ml Probe.

Anmerkungen: Von der Austauschersäule lassen sich nach dem angegebenen Verfahren Morfamquatmengen von 10 - 1000 µg mit 95 % Ausbeute eluieren. Die Konzentration im Eluat liegt dann zwischen 0.2 und 20 µg/ml. Dabei spielt die Probenmenge, aus der das Morfamquat abgetrennt wurde, keine Rolle. Im Bedarfsfall können auch größere Flüssigkeitsmengen über den Austauscher gegeben werden, um darauf das Morfamquat anzureichern. Wichtig ist das genaue Einhalten der Elutionsgeschwindigkeit.

Blut und Stuhl siehe Diquatbestimmung.

9. Mitochondrienpräparation

Die Isolation der Mitochondrienfraktion erfolgte in Abwandlung der Vorschrift von Guerra und Mitarbeitern (77) folgendermaßen:

Isolierung von Rattenlebermitochondrien.

a)Ausgewachsene männliche Sprague Dawley Ratten von 200 g werden durch Enthaupten getötet. Unmittelbar darauf wird die Leber herausgetrennt und in einen vorher gewogenen Meßzylinder mit 0,25 M

Saccharoselösung von $0^{o}$ - $4^{o}$C gegeben. Nachdem alle Tiere getötet sind, wird das Gesamtgewicht an Leber festgestellt.

b) Die Saccharoselösung wird abgegossen und die Organe durch zweimaliges Spülen mit wenig 0,25 M Saccharoselösung von $0^{o}$ - $4^{o}$C von Blut und Haaren befreit. Anschließend wird die Leber mit 0,25 M Saccharoselösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. und mit einer Schere zerkleinert. Diese Saccharoselösung mit Gewebestücken wird dann im Braun-Melsungen Homogenisator bei 800 rpm im Eisbad homogenisiert.

c) Das dabei entstandene Leberhomogenat wird in einer Sorvall Superspeed Zentrifuge (Rotor SS 34) bei 6000 rpm (2500 x g) 10 Min. lang zentrifugiert bei $0^{o}$ - $4^{o}$C.

d) Zur Erhöhung der Ausbeute wird bei wenig Leberhomogenat der Rückstand in $0^{o}$ - $4^{o}$C kalter 0,25 M Saccharoselösung aufgenommen, kurz homogenisiert und erneut bei 6000 rpm zentrifugiert.

e) Der Überstand von c) oder die vereinigten Überstände von c) und d) werden dann in der Sorvall Superspeed RC 2M (Rotor SS 34) bei 12.500 rpm (8.220 x g) 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zentrifugat wird mit etwas Saccharoselösung aufgeschlämmt und erneut 5 Minuten bei 12.500 rpm zentrifugiert.

f) Nach Verwerfen des Überstandes wird der aus Mitochondrien bestehende Rückstand mit Saccharoselösung im Volumenverhältnis von etwa 1 : 10 versetzt und kurz homogenisiert.

g) Dieses Mitochondrienhomogenat, von dem eine Proteinbestimmung durchgeführt wird , bleibt zur Aufbewahrung im Eisbad.

Isolierung von Rattenlungenmitochondrien.

Zur Isolierung von Lungenmitochondrien wird wie bei der Darstellung von Lebermitochondrien verfahren, jedoch ist zu beachten, daß die Ausbeute weit geringer ist. Um den Einsatz von zu vielen Tieren

(mindestens 3 Ratten à 200 g) zu vermeiden, kann das Mitochondrienhomogenat 1 : 20 mit Saccharoselösung verdünnt werden. Mit dieser Suspension können bei Messungen an der Beckman Sauerstoffelektrode noch ausreichende Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden.

10. Mikrosomenpräparation

Zur Herstellung des Leberhomogenats wurde wie bei der Mitochondrienisolierung verfahren. Dieses Homogenat wurde dann in der Sorvall Superspeed Zentrifuge (Rotor SS 34) bei 300 rpm (900 x g) bei $4^{o}$C 10 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 20 Min. bei 20.000 rpm (48.200 x g) vollständig von Mitochondrien befreit. In einer Beckman - L2 65K Ultrazentrifuge wurde der mikrosomale Überstand bei 160.000 x g (30.000 rpm) in 45 Min. in Mikrosomen und lösliche Fraktion aufgetrennt. Die abgesetzten Mikrosomen wurden in 0,15 M KCl-Lösung aufgenommen, homogenisiert und erneut 30 Min. zentrifugiert. Dann wurden die Mikrosomen im Volumenverhältnis 1 : 25 mit Tris-Puffer verdünnt und bei $4^{o}$D aufbewahrt. Die Proteinbestimmung ergab im Mittel 17,5 mg Protein/ml.

11. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Biuret-Methode von Gornall und Mitarbeitern (78) durchgeführt.

12. Atmungsmessungen

12.1. Atmungsmessungen an Mitochondrien

Zur Kontrolle des Sauerstoffverbrauchs wurde eine Beckman Oxygen Makro-Elektrode PG-TB-003 verwendet. Sie entspricht in ihrem Aufbau einer Clark-Elektrode. Der Aufbau des

Reaktionsgefäßes entsprach der bei Estabrook (79) geschilderten Apparatur. Der Sauerstoffgehalt der Lösung wurde der nachfolgenden Skala entnommen. Die Eichung des Nullpunktes am Servogor Laborschreiber erfolgte mit $Na_2S_2O_4$.

$O_2$ Gehalt/3 ml Pufferlösung bei $22^o$ C: 840 nMol
$23^o$ C: 810 nMol
$24^o$ C: 785 nMol
$25^o$ C: 775 nMol

Zur Verwendung kamen bei den Untersuchungen an Mitochondrien folgende Lösungen:

Isotonische Pufferlösung pH 7,4

| | | |
|---|---|---|
| Saccharose | 0,225 | M |
| $K_2HPO_4$ | 10 | mM |
| $MgCl_2$ | 20 | mM |
| KCl | 20 | mM |
| Triäthanol-amin-HCl | 20 | mM |

pH-Einstellung erfolgte mit conc. KOH durch Messung mit einer Glaselektrode am "Knick"-ph-Meter.

Succinatlösung: 0,5 M
ADP-Lösung: 90 mM
Paraquat-, Diquat-, Morfamquatlösung I: 6 mM
Paraquat-, Diquat-, Morfamquatlösung II: 300 mM

Entweder wurde Reinsubstanz gelöst oder die Handelspräparate wurden entsprechend verdünnt.

In die luftdicht verschließbare, mit einem Magnetrührer versehene Kammer wurden nacheinander folgende Mengen gegeben:

2,9 ml Puffer
0,05 ml Mitochondriensuspension
0,02 ml Succinatlösung

Der ADP-Zusatz betrug im allgemeinen 10 µl ADP-Lösung, das sind 900 nMol ADP. Der Herbicidzusatz erfolgte in Mengen von 5 µl, 25 µl und 50 µl Lösung I, entsprechend einer Herbicidendkonzentration von 0,01, 0,05 und 0,1 mM oder von 10 µl und 50 µl Lösung II, entsprechend 1,0 und 5,0 mM.

12.2 Atmungsmessungen an Mikrosomen

Es wurde die in Absatz 12.1 beschriebene Apparatur benutzt. Als Puffer wurde Tris-Saccharose Puffer pH 7,5 folgender Zusammensetzung verwendet:

| | |
|---|---|
| Trishydroxymethylaminomethan | 1,22 mM |
| Saccharose | 0,25 M |

Der bei der Mikrosomen-Isolierung verwendete Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

| | |
|---|---|
| Trishydroxymethylaminomethan | 5 mM |
| KCl | 150 mM |
| $MgCl_2$ | 10 mM |

Die Einstellung auf pH 7,5 erfolgte mit conc. KOH. Für die parallel zur Sauerstoffmessung verlaufende Messung der Absorptionsspektren wurde der Ansatz in eine luftdicht verschließbare Quarzküvette pipettiert. Als Vergleich diente ein Ansatz ohne Herbicidzusatz.

Reaktionsansatz:

| | |
|---|---|
| 2,8 ml | Tris-Saccharose-Puffer pH 7,5 |
| 0,150 ml | Mikrosomensuspension |
| 5 mg | NADPH od. 5 mg Ascorbinsäure |
| 0,05 ml | Herbicidlösung II |

13. Isolierung der basischen Zersetzungsprodukte des Morfamquat

1 g Morfamquat wurde 2 Minuten in 50 ml 1 N NaOH gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die alkalische Lösung fünfmal mit je 50 ml

$CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden am Rotationsverdampfer auf 25 ml eingeengt. Davon wurden jeweils 2 µl zur Untersuchung im MAT 111 verwendet. Die Trennung wurde auf Säule 2 unter folgenden Bedingungen vorgenommen:

Einspritzblock: 270° C
Säulentemperatur: 50 - 10°/Min - 250° C

14. Messungen der Stabilität und Intensität der Diquat- und Morfamquatradikale

Zur Untersuchung wurde ein 250 ml Dreihalskolben verwendet, der über einem Magnetrührer befestigt war. Durch die erste Öffnung wurde die Sauerstoff- und die Stickstoffzuleitung geführt. Außerdem befand sich eine dritte Bohrung in dem Stopfen, auf der ein Bunsenventil saß. Die zweite Öffnung nahm die Sauerstoffelektrode und die Glaselektrode für die pH-Messung auf. Durch den dritten Stopfen liefen die Anschlüsse für die Durchflußküvette und die Zuleitungen für den Laugenzusatz (n NaOH) und 5 % Natriumdithionitlösung, bzw. Ascorbinsäurelösung.

15. Vorbereitung der Versuchstiere

15.1. Resorptionsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Resorptionsunterschiede zwischen Reinsubstanzen und Handelspräparaten wurden je 4 Sprague Dawley Ratten ♂ à 200g folgende Herbicidmengen (1/4 $LD_{50}$) mit Wasser auf 0,5 ml gelöst bzw. aufgefüllt mit der Schlundsonde gegeben.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Paraquat: | 11,1 mg, | Gramoxone: | 37,5 µl |
| Diquat: | 29,5 mg, | Reglone: | 75,0 µl |
| Morfamquat: | 23,4 mg, | Rasen Primus: | 86,25 µl |

Die Exkremente wurden im Stoffwechselkäfig in 1 n HCl zur Vermeidung mikrobieller Zersetzung aufgefangen.

15.2. Sterblichkeit von Ratten nach Gabe von Reinsubstanz und Handelspräparat

Jeder der 12 Ratten ♂ à 200 g wurde mit der Schlundsonde die Hälfte der $LD_{50}$ (gelöst bzw. aufgefüllt mit 1 ml $H_2O$) gegeben:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Paraquat: | 22,2 mg, | Gramoxone: | 75,0 µl |
| Diquat: | 59,0 mg, | Reglone: | 150,0 µl |
| Morfamquat: | 46,8 mg, | Rasen Primus: | 172,5 µl |

15.3 Mitochondrienschädigung

Um die Schädigung von Mitochondrien nach Herbicidgabe zu verfolgen, wurden je 6 Sprague Dawley ♂ Ratten à 200 g die $LD_{50}$ gelöst in 1 ml $H_2O$ oral gegeben:

| | |
|---|---|
| Paraquat: | 44,4 mg |
| Diquat: | 118,0 mg |
| Morfamquat: | 93,6 mg |

Nach drei Tagen wurden die Tiere getötet und die Mitochondrien präpariert.

15.4 Einfluß von Enzyminduktion und Ascorbinsäuregabe auf die Sterblichkeit von Versuchstieren

Für jedes der 3 Herbicide wurden 36 Sprague Dawley Ratten ♂ à 200 g in drei Gruppen geteilt. Eine Gruppe davon wurde mit Phenobarbital-Na folgendermaßen vorbehandelt: 72, 60, 48 und 24 Stunden vor Herbicidgabe wurden jeweils 16 mg (mit Wasser ad 0,4 ml gelöst) Phenobarbital-Na intraperitoneal gespritzt. Bei Versuchsbeginn wurden allen 36 Tieren die $LD_{50}$ oral verabfolgt (Mengen s. 15.3). Einer der beiden nicht vorbehandelten Versuchsgruppen wurde von diesem Zeitpunkt an Ascorbinsäure gegeben. Dazu wurde täglich mit der Schlundsonde jedem Tier zweimal 50mg Natriumascorbat (gelöst in 1 ml $H_2O$) verabfolgt.

## V. Literaturverzeichnis


1. Weidel H., Russo M., Monatsh. Chem., 3, 863 (1882)
2. Brian R.C., Homer R.F., Stubbs J., Jones R.L., Nature 181, 446 (1958)
3. Jeater R.S.L., Agr. Vet. Chem. 4, 23 (1963)
4. Brian R.C., Imperial Chemical Industries, Ltd., Jealotts' Hill Research Station, Brackwell, England, personal communication, zitiert nach 45.
5. Hofmann A.W., Ber. 14, 1503 (1881)
6. Sasse W.H.F., Snieckus V.A., Boekelheide V., Org. Syn. 46, 5 (1966)
7. Homer R.F., Tomlinson T.E., Nature 184, 2012 (1959)
8. EP. 857 501 (23.4.58/29.12.60) ICI. Ltd. Homer R.F.
9. EP. 1 070 504 (31.1.63/1.6.67) ICI. Ltd. Homer R.F., Downes J.E.
10. Homer R.F., Tomlinson T.E., J. Chem. Soc. 1960 II 2494
11. Calder J.C., Spotswood, Sasse W.H.F., Tetrahedron Letters 46, 95 (1963)
12. Belg. Pat. 627 246 ICI. Ltd./Downes J.E., Headford D.W.R.
13. Heterocyclic Compounds Pyridine and Derivates, Part two, p. 57, Edit. Erwin Klingsberg, Interscience Publishers, New York and London 1961
14. Homer R.F., Mees G.C., Tomlinson T.E., J. Sci. Food Agric. 11, 309 (1960)
15. Weitz E., Angew. Chem. 66, 658 (1954)
16. Karlson P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme-Verlag Stuttgart 1970, S. 169

17. Kok B., Rurainski R.J., Owens O.V.H., Biochim. Biophys. Acta 109, 349 (1965)

18. Zweig G., Shavit N., Avron M., Biochim. Biophys. Acta 109, 332 (1965)

19. Baldwin B.C., Bray M.F., Geoghegan M.J., Biochem. J. 101, 15 P (1966)

20. Editorial Brit. Med. J. 1967/1, 690

21. Somman P., Johnston E.N.M., Brit.Med. J. 1969/2, 818

22. Bullivant D.M., Brit. Med. J. 1966/1, 1272

23. Clark D.G., McElligott T.F., Hurst E.W., Brit. J. Industr. Med. 23, 126 (1966)

24. Almog Ch., Tal E., Brit. Med. J. 1967/3, 721

25. Mourin K.A., Brit. Med. J. 1967/4, 486

26. Campbell S., Lancet 1968/1, 144

27. Oreopoulos D.G., Soyanuwo M.A.O., Sinniah R. et al., Brit. Med. J. 1968/1, 749

28. Malone J.D.G., Carmody M., Keogh B., O'Dwyer, J. Irish. med. Ass. 64, 59 (1971)

29. Lanzinger G., Ritz E., Franz H.E., Kuhn H.M., Klein H., Münch. med. Wschr. 111, 944 (1969)

30. Tilling W., Dtsch. med. Wschr. 93, 2439 (1968)

31. Beyer K.H., Dtsch. Apoth.-Ztg. 110, 633 (1970

32. US. Pat.2 597 260 (20.5.1952) R.A. Reck Armour & Co. DBP 844 006 (28.9.1950) BASF Weiß E.

33. Knorr L., Ber. Dtsch. chem. Ges. 16, 1267 (1883)

34. König K.H., Pommer E.H., Sanne W., Angew. Chem. 77, 327 (1965)

35. Klimmer O.R., Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfungsmittel Hundt-Verlag, Hattingen 1971, S. 106

36. Methodensammlung zur Rückstandsbestimmung von Pflanzenschutzmitteln, DFG Weinheim Bergstraße: Verlag Chemie 1969

37. Akhavein A.A., Linscott D.L., Res. Rev. 1969, 110

38. Slade P. und Smith A.E., Nature 213, 919 (1967)

39. Hollemann-Wiberg, Lehrbuch der Anorg. Chemie, Berlin, Walter de Gruyter 1960, S. 167

40. Zhemchuzhin S.G., Akimova N.N., Otkrytya, Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki 1970, 47 (31), 133 nach C.A. 75 75211 b (1971)

41. Bradford L.W., und Brackett J.W., Mikrochim. Acta 353 (1958)

42. Clark D.G., Brit. J. industr. Med. 28, 186 (1971)

43. Radelli L. und Bosetto M., Analyt. Abstracts 18, 1:612 (1970)

44. Calderbank A., Res. Rev. Vol. 12, 14 (1966)

45. Calderbank A., Advances in Rest Control Research 1968 S. 217

46. Belg. Patent 627.246 ICI Ltd/Dawnes J.E. und Headford D.W.R.

47. Schwarz W.M., Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, zitiert nach 49

48. Farringron G.A., ICI Jealatts Hill Research Station, Bracknel personal communication 1966, zitiert nach 45

49. Kosower E.M., Cotte J.L., J. Amer. chem. Soc. 86, 5524 (1964)

50. BASF, Landwirtsch. Versuchsstation, persönliche Mitteilung 5.7.71

51. Reis R., Arzneimittelforsch. 6, 77 (1956)

52. Ruf E., Z. Anal. Chem. 204, 344 (1964)

53. Ballard C.W., Isaacs J., Scott P.G.W., J. Pharm. Pharmacol. 6, 971 (1954)

54. Sheiham I., Pinfold T.A., Analyt. 94, 387 (1969)

55. BASF Landwirtsch. Versuchsstation, persönliche Mitteilung 11.8.72

56. World Rev. of Pest Control, Spring 1962, 1 Part 1

57. Daniel J.W., Gage J.C., Brit. J. Ind. Med. 23, 133 (1966)

58. Dorte I.E., Outlook Agr. 5, 208 (1968)

59. Bozarth G.A., Funderburk H.H., Carl E.A., Weed. Soc. Amer. Ast. 55 (1966)

60. Baldwin B.C., Bray M.F., Geoghegan M.J., Biochem J. 101, 15 (1966)

61. Mees G.C., Ann. appl. Biol. 48, 601 (1960)

62. Packer L., Wishniac W., Biochem. et Biophys. Acta 17, 153 (1955)

63. Tamiya N., Joichi K., Kameyama T., Akabori S., J. Biochem. 42, 613 (1955)

64. Gage J.C. Biochem. J. 109, 757-61 (1968)

65. Chana B., Williams G.R., Nature 175, 1120 (1955)

66. Lardy H., Wellman H., J. Biol. Chem. 195, 215 (1952)

67. Hagihara B., Biochim. Biophys. Acta 46, 134 (1961)

68. Orr C.W.M., Biochem J. 100, 20 P (1966)

69. Chvapil M., Hurych J., Ehrlichová E., Tichý M., European

70. Chvapil M., Hurych J., Ehrlichová E., Čmuchalová B., Biochim. Biophys. Acta 140, 339 (1967)

71. Ullrich V., Schnabel K.H., Drug Metab. 1, 176 (1973)

72. Editorial, Drug Metab. 1, 391 (1971)

73. Thies H. und Rekther F.W., Naturwissenschaften 41, 230 (1954)

74. EP. 999 585 (22.1.1962/28.7.1965) ICI Ltd. J.E. Downes D.W.R. Headford

75. Organikum 6. Auflage 1967, S. 194 VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften

76. Organikum 6. Auflage 1967, S. 579 VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften

77. Guerra F.C., Albuquerque A.A., Santos Mota J.M., Van Golde L.M.G., Biochim. Biophys. Acta 234, 222-225 (1971)

78. Gormall A.G., Bardawill C.J. and David N.M., J. Biol. Chem. 177, 715 (1949)

79. Estabrook R.W., Method. in Enzym., Herausgeber S.P. Collowitz und Caplan N.O., 10, 41 (1962)

## Lebenslauf

Am 17. November 1944 wurde ich als Sohn der Fürsorgerin Irmgard Bothe und des Tierarztes Friedrich Baaz in Godendorf/Stargard geboren. Vom Oktober 1950 an besuchte ich die 3. Grundschule in Berlin-Wedding. Im März 1954 starb meine Mutter nach längerem Leiden an Krebs. Da mein Vater in Ybbsitz/Niederösterreich lebt, blieb ich bei meiner Großmutter. Im April 1954 wechselte ich auf das Gymnasium zu Berlin-Steglitz über, an dem ich im März 1963 das Abitur bestand. Nach einer halbjährigen Ausbildungsunterbrechung zum Gelderwerb begann ich im Oktober 1963 die Praktikantenzeit in der Schloß-Apotheke Berlin-Steglitz. Im September 1965 bestand ich die Pharmazeutische Vorprüfung und arbeitete ein Jahr lang in Berliner Apotheken als Vorexaminierter. Von Oktober 1966 an studierte ich an der Freien Universität Berlin Pharmazie, legte im Oktober 1969 das Staatsexamen ab und begann danach unter der Leitung von Professor Dr. G. Schenck und Dr. K.H. Beyer mit der vorliegenden Dissertation.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3 12 88 85 - 3 13 81 98